



Rôle des acides gras polyinsaturés alimentaires dans l'homéostasie lipidique de la rétine en conditions physiologiques et pathologiques liées au vieillissement

Magalie Thierry

► To cite this version:

Magalie Thierry. Rôle des acides gras polyinsaturés alimentaires dans l'homéostasie lipidique de la rétine en conditions physiologiques et pathologiques liées au vieillissement. Alimentation et Nutrition. Université de Bourgogne, 2014. Français. NNT : 2014DIJOS044 . tel-01131544

HAL Id: tel-01131544

<https://theses.hal.science/tel-01131544>

Submitted on 13 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
Ecole doctorale Environnements-Santé

THESE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Sciences de la vie

Présentée et soutenue publiquement par

Magalie THIERRY

Le 19 Novembre 2014

**Rôle des acides gras polyinsaturés alimentaires dans
l'homéostasie lipidique de la rétine en conditions
physiologiques et pathologiques liées au vieillissement**

Directeur de thèse : **Lionel BRETILLON**

Mr Alain BRON	<i>Professeur, Université de Bourgogne, Praticien hospitalier, CHU Dijon</i>	Président
Mme Cécile DELCOURT	<i>Chargé de recherches, INSERM Bordeaux</i>	Rapporteur
Mr Florian SENNLAUB	<i>Directeur de recherches, INSERM Paris</i>	Rapporteur
Mr Michel NARCE	<i>Professeur, Université de Bourgogne</i>	Examineur
Mme Martine CLARET	<i>Docteur en pharmacie, Laboratoires Horus Pharma, Saint Laurent du Var</i>	Examinatrice
Mr Lionel BRETILLON	<i>Directeur de recherches, CSGA Dijon</i>	Directeur de thèse

À ma mère Sylvie, à mon père Jean-Marie

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été menés au sein de l'équipe Œil, nutrition et signalisation cellulaire sous la direction de Lionel Bretillon à l'UMR CSGA INRA 1324 CNRS 6265 dirigée par Luc Pénicaud.

Mes remerciements s'adresseront en premier lieu à mon directeur de thèse **Lionel Bretillon**, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci de m'avoir accueillie au sein de ton équipe, pour la confiance que tu m'as accordée, ta disponibilité constante malgré tes responsabilités, ton encadrement, notre complicité, et enfin pour m'avoir donné l'opportunité de tirer le meilleur de moi-même pendant ces 3 années. Tu m'as fait gagner en maturité, en autonomie, je ne pourrai jamais assez t'en remercier.

Un grand merci aux laboratoires **Horus Pharma** pour avoir contribué grandement au soutien financier de ce projet et pour avoir assuré ma participation à de nombreux congrès. Merci à Martine Claret, Claude Claret et Carole Gard pour votre suivi assidu, nos échanges réguliers toujours forts sympathiques et enrichissants et pour me donner l'opportunité d'assurer mon avenir proche au sein de vos laboratoires.

Merci qui plus est, au **conseil régional de Bourgogne** d'avoir soutenu financièrement ce projet.

Merci aux membres de mon comité de thèse: **Gérard Lizard** et **Corine Joffre**, pour votre point de vue scientifique et pour les échanges constructifs que nous avons eu ensemble.

Merci **Serge Monier**, pour votre amabilité et votre aide technique au Luminex à la plateforme de cytométrie de la faculté de Médecine.

Merci **Jean-François Merlin**, pour ton attention et pour m'avoir formée à utiliser l'EchoMRI sur le Plateau technique de phénotypage métabolique et comportemental du petit animal.

Je tiens à présent à remercier plus particulièrement mes collègues du labO qui ont contribué de près à la réalisation de ce projet tant sur le plan professionnel que relationnel.

Bruno, pour avoir pris soin de mes 657 bébés pendant ces 3 années, pour ton aide précieuse dans la « manip pharaonique du siècle » telle que tu l'as surnommée, pour toutes les connaissances en physiologie que tu m'as apportées et pour nos heures passées à refaire le monde en salle de dissection. Je te souhaite plus que tout de parvenir à retrouver l'équilibre professionnel et personnel qui te tient tant à cœur.

Niyazi, pour m'avoir tout appris sur l'ERG et les angiOs, pour ta patience sans faille, ta gentillesse, tes nombreux conseils scientifiques et techniques (réparation de chaussure en urgence avec un chewing gum, raccordement de machine à laver, nettoyage de canapé au Mat et j'en passe...). Je te souhaite le meilleur d'un point de vue professionnel mais également sur le plan personnel, longue vie aux kébabs à Genlis...

Une pensée pour **mon p'tit Steph**, tout d'abord pour ton investissement professionnel dans mes analyses lipidiques en tous genres mais aussi pour ces bons moments passés à raconter nos vies au chromatO ou autour d'un verre et à se soutenir mutuellement face aux épreuves de la vie, prend soin de toi et n'oublie pas de venir me voir au soleil.

Valou, je me souviens encore le premier jour où nous nous sommes rencontrées, où l'on s'imaginait mutuellement avec la trentaine bien tassée, du fait de nos prénoms d'une autre génération. Merci pour la qualité et la quantité de travail en analyse lipidique que tu as fournies, pour notre amitié, tu resteras l'une de mes plus belles rencontres de ces années passées à Dijon.

Emilie, ma prédécesseuse, qui m'a initiée à la vie de thésarde, qui a répondu à toutes mes questions et inquiétudes, merci pour nos fous rires, nos longues discussions, c'est toujours un grand plaisir de se revoir pour une petite soirée filles, je te souhaite un plein épanouissement dans ta vie future.

Sarah, notre expatriée américaine, merci pour ta prévenance, ta rigueur scientifique est un bel exemple de réussite, je te souhaite tout plein de bonheur avec ta petite famille dans ce lointain pays.

Julie et Estelle, dès le premier jour où vous êtes arrivées j'ai ressenti immédiatement que vous étiez deux filles géniales, et je ne m'étais pas trompée ! Quel bonheur de travailler à vos côtés au quotidien, merci pour ces bons moments et soirées passées ensemble, nos discussions de filles autour d'une petite tisane ! Julie, je te souhaite le meilleur pour cette thèse débutante et que tu rencontres enfin l'homme parfait qui saura t'apprécier à ta juste valeur pas comme l'autre bougre de zigoto. Estelle, prend soin de toi et de Samy, notre miraculé... le meilleur reste à venir !

Cynthia, pour nos longues discussions, tu es une preuve de courage et d'obstination, te rencontrer fut pour moi une véritable leçon de morale, je te souhaite un plein épanouissement professionnel, que tu sois reconnu enfin comme un chercheur à part entière, mais aussi plein de bonheur avec Martial et tes deux fripons que j'ai adorés « baby-sitter ».

Zeinab, pour ta gentillesse, ta disponibilité, pour nous avoir fait découvrir ta culture, ce fut un véritable bonheur de partager ce bureau ensemble, j'allais oublier....merci pour avoir sauvé ma dignité capillaire, je te souhaite le meilleur pour la suite, que ces fichues manip marchent enfin, mais surtout plein de bonheur avec ton fiancé.

Ségolène, pour ton sourire radieux, ta gentillesse et les bilans lipidiques que tu m'as permis de réaliser au laboratoire de biochimie clinique.

Bénédicte, pour ton rire représentatif de ta bonne humeur inébranlable et ton aide technique en RT-qPCR.

Marie-Annick, pour ta sympathie, l'organisation de nos formations et tes conseils en immunohisto.

Lucy, pour ta prévenance, ta gentillesse au quotidien et ta bienveillance telle une maman, merci pour ces bons moments partagés à tes côtés...

Laurent, notre sagittaire international préféré, pour avoir partagé ma passion pour le vélo, pour ton aide au luminex et nos entraînements aux flatmounts.

Rodolphe, pour nos discussions dans ton bureau lors de mes analyses stats, ta gentillesse, ton humour (je n'aborderai pas l'épisode des chips ou les batailles d'eau grrr)

Elodie, pour m'avoir supportée en tant que colloc aux îles San Juan, pour ta bonne humeur quotidienne, je te souhaite tout plein de bonheur avec Jérôme et tes deux petits loups.

Olivier, mon fidèle compatriote de pistoche, pour nos discussions aquatiques, pour m'avoir initiée au Saint Vêran, pour notre voyage magnifique au pays des baleines avec ta chère et tendre, ce fut un réel bonheur de partager ces moments de dépaysement et de bonheur à vos côtés.

NicO, pour ta pseudO fausse bonne humeur au labO, pour m'avoir permis de survivre grâce aux dosettes nespressO et pour être toujours partant pour un petit apérO.

Franck, pour nos trocs, nos longues discussions sur le perron à commérer et à refaire le monde, une belle rencontre !

Marie-Chantal, pour ta bienveillance, ton soutien et les heures passées à discuter ensemble, pour m'avoir appris à disséquer les glandes salivaires, je te souhaite une belle fin de carrière qui corresponde véritablement à tes attentes.

Raymond, Laurence, Sandra et Elise pour votre sympathie pendant les nombreuses heures passées à l'animalerie.

Anthony, « mon tout premier stagiaire ! », merci pour ton assiduité, la qualité de ton travail, nos fous rires (« Nif Nif et Naf Naf oublient de nettoyer la paille de l'animalerie... »). Pour nos échanges perpétuels, en espérant de tout cœur travailler de nouveau un jour avec toi.

Kévin, mon stagiaire 2^{ème} du nom, merci pour ton investissement et ta gentillesse, tu disposes de grandes qualités scientifiques tu iras loin, accroche toi et aie confiance en toi !

Maëlle, mon autre petite stagiaire, bravo pour ton travail en analyse lipidique sur mes foies de rats, de rapidité et d'efficacité tu as su faire preuve, bon courage à toi pour la suite.

Côté clinique... Je tiens sincèrement à remercier

Le Professeur Alain Bron, notre papa à tous, pour son suivi assidu, son point de vue clinique, ses nombreux conseils avisés, ses corrections sur mes articles, sa bonne humeur et son entrain que ce soit en congrès ou à l'INRA, pour m'avoir « déroulé le tapis rouge » au CHU afin d'y réaliser mes OCT et pour m'avoir finalement présenté l'homme qui partage aujourd'hui ma vie.

Le Professeur Catherine Creuzot-Garcher, pour tout l'intérêt manifesté sur mes travaux, pour son avis clinique ainsi que pour la relecture des articles.

Le professeur Balwantray Chauhan, pour notre long échange constructif au congrès de l'ARVO et pour m'avoir fourni une lentille spécifique pour mes OCT.

Mes remerciements s'adresseront aussi à

ma famille du vélo

Ma binomette de choc et meilleure amie Elsa, voilà maintenant 5 ans que nous nous sommes rencontrées à Monaco sur le départ du TDF 2009, un signe... le début d'une belle amitié... Quel bonheur de s'échapper pour un petit séjour à Paris, de partager notre quotidien, notre passion pour le cyclisme, nos amours, nos angoisses sur les courses ou ailleurs. Je te souhaite d'être tout simplement heureuse, de trouver l'homme de ta vie. Merci de m'avoir tant soutenue... Je t'adore !

Mon titi, mon fond de fût, ma ptite gueule de Pelicab, mais avant tout mon confident, pour les heures passées à tes côtés dans le Tagazou, nos délires, nos sessions courses du Dauphiné, Paris-Tours et Paris-Roubaix, ta bienveillance, ton aide sans compter...RDV prochainement dans ta Corrèze tu ne te débarrasseras pas de « ta Bricole » comme ça !

John, Erwan, Astrid, Loulou, Chloé, Maddy, Elise, Marionnette, Charles, Trompette, l'équipe de pilotes HRP A.S.O, l'ensemble de la Team Vittel/Powerbar, les copines podium girls ... pour m'avoir fait évacuer le stress de la thèse... Pour avoir bu, ri, vibré et transpiré à vos côtés...Merci pour ces moments de pur bonheur cycliste pendant toutes ces années, vous allez terriblement me manquer...

mes copines miss

Fannette, Laeti, AL dite Vieux-cul, Laurette, Fanfan merci pour votre soutien en toutes circonstances les coupines ! Pour tous ces événements heureux partagés à vos côtés : mariages, bébés, pour nos soirées arrosées chez Momo à Besak à finir au Bristol, pour notre groupe de discussion What's app où je débarquais toujours avec 60 messages de retard...

mes amis

Aline, ma meilleure cop de fac, qui m'a soutenue pendant l'épisode Miss France et le dur retour à la réalité qui a suivi, qui m'a fait traverser le monde pour venir la retrouver à SF, que de bonheur passé à tes côtés, d'années de folie à Besançon ou en classe de mer à étudier le plancton végétal et le plancton animal, à apprendre tous les insectes des cours d'eau, à creuser des trous avec notre tarière, à apprendre la flore de Franche-Comté, les coquillages, les algues, les poissons des étangs, cette réussite je te la dois en grande partie c'est toi qui m'a donné l'envie de plaquer l'écologie pour étudier la nutrition ! Tu me manques mon raton !

Flavien dit rabbitou, mon meilleur ami depuis la 5^{ème} (où je te copiais dessus en latin, je peux enfin l'avouer) pour toutes nos épopées au lycée, pour les années passées en fac à Nancy à faire la fête, les vacances de folie avec Thib et Benjitou, nos soirées au téléphone à se remonter le moral, les we à Chambéry, pour prendre soin de mes quenottes, pour avoir grandi à tes côtés tout simplement, prend soin de toi et de « Bibile Chérie ».

Benjamin dit Benjitou, que de souvenirs mémorables du Lycée aux années facs à Besak, arrête la cardio et reviens nous tu nous manques...

Thib, pour avoir passé 10 belles années à tes côtés, pour avoir découvert la vie, grandi et évolué ensemble, pour s'être soutenus mutuellement, les difficultés de ces dernières années associées à la distance qui nous séparait aura eu raison de notre essoufflement, je ne pourrai jamais pour autant t'oublier ...

ma famille

Ma maman, Sylvie, pour avoir toujours veillé sur moi, pour m'avoir donné les moyens d'y parvenir, pour ta personnalité et ta force psychologique que tu as su me transmettre, cette thèse c'est aussi un petit bout de toi !

Mon père, Jean-Marie, pour m'avoir toujours dit de continuer mes études le plus loin possible, de ne pas faire comme toi pour ne pas avoir à regretter un jour, ça y est tu vois on y est Bac +8 je ne peux pas plus... merci pour ta sagesse et ton soutien.

Mon Sisteron, Annelise, pour les moments de recueil au creux de nos lits à « geeker » ensemble toutes les 2, à se raconter nos histoires, pour ta présence, ton « amour sororal », tu me manques, grand besoin de te retrouver et de profiter un peu maintenant que tout cela est terminé...

Mon « Beautiful Daddy », Bernard, même si nos rapports n'ont pas toujours été simples tu as toujours été là pour moi quoiqu'il m'arrive... Merci pour ton soutien, les nombreux allers-retours que tu as pu faire à Dijon pour m'aider, je te copie finalement en optant pour la voie de l'industrie pharmaceutique...Prend soin de toi et de maman !

Ma Belle-Mère Pierrette, pour votre gentillesse à mon égard, votre joie de vivre, votre humeur toujours égale et pour prendre soin de mon père en toute situation.

Mes grands-parents, Antoinette et Jacky pour m'avoir élevée comme votre propre fille, inculqué les valeurs de la vie, avoir toujours pris soin de moi et pour m'avoir constamment soutenue dans mes choix, j'espère que vous serez fiers de votre petite fille...

Mes grands-parents d'adoption, Phiphi et Mutti, pour m'avoir toujours considérée comme votre petite fille et avoir pris soin de moi les we ou j'étais chez mon père, pour votre soutien, votre gentillesse, vous êtes des personnes exceptionnelles qui ont grandement contribué à mon équilibre de vie. Je vous souhaite malgré la souffrance d'appréhender les années futures dans la sérénité.

Mon amour, J-C, pour cette rencontre qui a bouleversé nos vies un soir de janvier en salle d'angio /OCT, merci pour ton expertise clinique lors de ces séances réalisées sur mes rats (Sergio et Yoyo). Tu as su changé ma vision des choses au quotidien. Tu m'as offert bonheur et légèreté malgré le stress oppressant de nos thèses respectives. Pour cette complémentarité qui nous unit, pour cette vie à tes côtés, pour ce destin rêvé qui s'offre à nous au soleil, pour cette certitude d'avoir rencontré l'homme de ma vie... Je t'aime.

PS : A nos 2 rats adoptifs, Sergio et Yoyo...et à Biglouche notre poisson rouge.

A mes 655 autres rats, paix à leur âme...

Sommaire

REMERCIEMENTS.....	5
INDEX DES FIGURES	17
INDEX DES TABLEAUX	18
LISTE DES ABREVIATIONS	19
RÉSUMÉ.....	22
ABSTRACT	24
INTRODUCTION GENERALE	27
CHAPITRE 1.....	31
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE.....	31
I- Anatomie et physiologie de l'œil et de la rétine	32
I.1 Le globe oculaire	33
I.1.1 La tunique sclérale.....	33
I.1.2 La tunique uvéale.....	34
I.1.3 La tunique nerveuse	35
I.1.3.1 L'épithélium pigmentaire rétinien	38
I.1.3.2 La rétine neurale	39
I.1.3.2.1 Anatomie macroscopique	39
I.1.3.2.2 Anatomie microscopique.....	41
I.2 Les réseaux vasculaires	49
I.2.1 Le système vasculaire rétinien.....	50
I.2.2 Le système vasculaire chorôïdien	51

I.2.3 La barrière hémato-rétinienne.....	52
II- Le syndrome métabolique	55
II.1 Fructose et Syndrome métabolique.....	57
II.1.1 La digestion des glucides	57
II.1.2 Le métabolisme du fructose	58
II.1.3 Métabolisme énergétique, prise de poids et régulation de la prise alimentaire.....	60
II.1.4 Consommation de fructose et insulino-résistance	63
II.2 Le diabète de type 2 et la rétinopathie diabétique (RD)	64
II.2.1 Epidémiologie et physiopathologie du diabète de type 2.....	64
II.2.2 Les modèles animaux de diabète.....	66
II.2.3 La rétinopathie diabétique	68
II.2.3.1 Epidémiologie.....	68
II.2.3.2 Sémiologie	68
<i>Adapté de l'EMC d'ophtalmologie © Elsevier Masson SAS</i>	70
II.2.3.3 Physiopathogénie.....	70
II.2.3.4 Les modèles animaux de rétinopathie diabétique	76
II.3 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).....	78
II.3.1 Epidémiologie	81
II.3.2 Facteurs de risques environnementaux et génétiques.....	81
II.3.3 Physiopathogénie de la DMLA	84
II.3.3.1 Des formes précoces aux formes atrophiques	84
II.3.3.2 Les formes néovasculaires	87
II.3.4 Les modèles animaux de DMLA	87
III. Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne de type oméga 3.....	90
III.1 Structure et propriétés physico-chimiques des acides gras.....	90
III.2 Production de médiateurs lipidiques à partir des acides gras polyinsaturés	92
III.3 Les sources alimentaires d'AGPI-LC oméga 3 et apports nutritionnels conseillés.....	96
III.4 Transport et accréction des AGPI-LC dans la rétine.....	97
III.5 Rôle de l'EPA et du DHA dans la rétine	99
III.5.1 Rôle structural	99

III.5.2 Déficiences en DHA, conséquences fonctionnelles et statut tissulaire.....	99
III.5.3 Importance dans les mécanismes de phototransduction	100
III.5.4 Expression génique	101
III.6 Oméga 3 et Syndrome Métabolique	101
III.7 Oméga 3 et pathologies rétinienne.....	102
III.7.1 Oméga 3 et Rétinopathie diabétique	102
III.7-2 Oméga 3 et rétinopathie du prématuré (ROP)	104
III.7-3 Oméga 3 et DMLA	104
 CHAPITRE 2.....	109
 CARACTERISATION DE L'ADAPTATION DE LA RETINE A UN REGIME	
DIABETOGENE A COURT TERME	109
I-Problématique.....	110
II-Article.....	111
III-Résultats et conclusions principales.....	138
 CHAPITRE 3.....	141
 CARACTERISATION DE L'ADAPTATION DE LA RETINE A UN REGIME	
DIABETOGENE A LONG TERME	141
I-Problématique.....	142
II-Article.....	143
III-Résultats et conclusions principales.....	156

CHAPITRE 4.....	159
MODULATION DE LA REPONSE DE LA RETINE PAR UNE APPROCHE NUTRITIONNELLE A BASE D'ACIDE GRAS POLYINSATURES A LONGUE CHAINE DE TYPE OMEGA 3 DANS LE CADRE D'UN SYNDROME METABOLIQUE.....	159
I-Problématique.....	160
II-Article.....	162
III-Résultats et conclusions principales.....	192
CHAPITRE 5.....	195
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	195
CHAPITRE 6.....	207
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	207

Index des figures

<i>Figure 1 : Représentation horizontale sagittale d'une coupe d'œil humain</i>	<i>33</i>
<i>Figure 2 : Anatomie de la rétine</i>	<i>37</i>
<i>Figure 3 : Photographies du fond d'œil avec repères anatomiques et dimensions des différentes zones rétinienne</i>	<i>41</i>
<i>Figure 4 : La structure des cônes et des bâtonnets</i>	<i>43</i>
<i>Figure 5 : activation de la cascade de phototransduction des bâtonnets</i>	<i>45</i>
<i>Figure 6 : Le cycle visuel des vertébrés</i>	<i>46</i>
<i>Figure 7 : Localisation des vaisseaux rétinien et choroïdien par rapport aux différentes couches rétinienne</i>	<i>50</i>
<i>Figure 8 : Représentation schématique des vaisseaux choroïdien (A) et des veines vorticeuses (B).....</i>	<i>52</i>
<i>Figure 9 : Représentation des barrières hémato-rétinienne interne et externe.....</i>	<i>54</i>
<i>Figure 10 : Représentation schématique du Syndrome métabolique.....</i>	<i>56</i>
<i>Figure 11 : Processus de digestion et d'absorption des nutriments</i>	<i>58</i>
<i>Figure 12 : Le métabolisme du fructose</i>	<i>60</i>
<i>Figure 13 : Illustration sémiologique de la RD</i>	<i>70</i>
<i>Figure 14 : Formation des produits de glycation avancés (AGE)</i>	<i>72</i>
<i>Figure 15 : Les différentes formes de DMLA.....</i>	<i>79</i>
<i>Figure 16 : Structure des acides gras oméga 6 et oméga 3</i>	<i>91</i>
<i>Figure 17 : Représentation schématique de la synthèse des eicosanoïdes via la voie de la cyclooxygénase</i>	<i>94</i>
<i>Figure 18 : Mécanismes de biosynthèse des résolvines, protectines et marésines à partir de l'EPA et du DHA.....</i>	<i>94</i>
<i>Figure 19 : Représentation schématique de la synthèse des eicosanoïdes via la voie des lipooxygénases (LOX).....</i>	<i>95</i>
<i>Figure 20 : Extrapolation logarithmique pour différents micronutriments</i>	<i>201</i>
<i>Figure 21 : Extrapolation logarithmique de Rucker and Storms adaptée au DHA</i>	<i>202</i>
<i>Figure 22 : Schémas bilans synthétiques</i>	<i>206</i>

Index des tableaux

<i>Tableau 1 : Modèles animaux de diabète</i>	<i>67</i>
<i>Tableau 2 : Modèles rongeurs de RD.....</i>	<i>77</i>
<i>Tableau 3 : Variants des gènes associés à la pathologie de la DMLA</i>	<i>83</i>
<i>Tableau 4 : Apport nutritionnels conseillés en oméga 3</i>	<i>97</i>
<i>Tableau 5 : Récapitulatif des études cliniques étudiant l'effet des omégas 3 sur les MLA et DMLA .</i>	<i>106</i>

Liste des abréviations

AA : Acide arachidonique

AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire des aliments

AG : Acide gras

AGE : Produits de glycation avancés

AGL : Acide gras libre

AGMI : Acide gras mono-insaturé

AGPI-LC : Acide gras polyinsaturé à longue chaîne

AGS : Acide gras saturé

ALA : Acide alpha linoléique

ANC : Apports nutritionnels conseillés

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail

APO : Apolipoprotéine

AREDS : Age-related eye disease study

BHR : Barrière hémato rétinienne

CFH : Complement factor h

CNV : Choroidal neovascularization

COX : Cyclooxygénase

CRP : C-reactive protein

DAG : Diacylglycérol

DHA : Docosahexaenoic acid

dGLA : Dihomo gamma linolenic acid

DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge

DPA : Docosapentaenoic acid

EGF : Epidermal growth factor

ELOVL : Elongation of very long chain fatty acid proteins

EPA : Eicosapentaenoic acid

EPR : Épithélium pigmentaire rétinien

FGF : Fibroblast growth factor

GLUT : Glucose transporter

HDL : High density lipoprotein

IGF : Insulin growth factor

IL : Interleukine

IR : Insulin receptor

LDL : Low density lipoprotein

LT : Leucotriènes

MB : Membrane de Bruch

MLA : Maculopathies liées à l'âge

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NPD1 : Neuroprotectine D1

NPY : Neuropeptide Y

OCT : Optical coherence tomography

PC : Phosphatidylcholine

PDGF : Platelet derived growth factor

PEA : Phosphatidyléthanolamine

PG : Prostaglandines

PGI : Prostacyclines

PI : Phosphatidylinositol

PKC : Protéine kinase C

POMC : Protiomelanocortin

PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor

PS : Phosphatidylsérine

RAA : Rénine angotensine aldostérone

RAGE : Récepteurs des produits de glycation avancés

RD : Rétinopathie diabétique

RDP : Rétinopathie diabétique proliférante

Rho : Rhodopsine

ROS : Reactive oxygen species

ROP : Retinopathy of the prematurity

RP : Rétinite pigmentaire

RPE65 : Retinal pigmentary epithelium 65

RXR : Retinoid x receptor

SDH : Sorbitol déshydrogénase

SMet : Syndrome métabolique

SNC : Système nerveux central

T2D : Type 2 diabetes

TG : Triacylglycerol

TGF β : Transforming growth factor beta

TNF : Tumor necrosis factor

TK : Tyrosine kinase

TX : Thromboxane

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VLDL : Very low density lipoprotein

Résumé

La rétine est constituée de l'association d'un tissu neurosensoriel et de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). Malgré la présence d'une barrière hémato-rétinienne, la rétine est contrainte aux changements de son milieu environnant, incluant les modifications du régime alimentaire et les stress environnementaux. Au cours du vieillissement, les échanges de nutriments et l'élimination des déchets métaboliques et cellulaires au travers de l'EPR diminuent. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et la rétinopathie diabétique (RD) sont les pathologies rétinienne les plus prévalentes dans les populations occidentales avant et après l'âge de 50 ans, respectivement. L'atrophie géographique et la DMLA néovasculaire constituent les stades avancés des maculopathies liées à l'âge. La RD affecte 60% des patients atteints de diabète de type 2 (T2D) dans les 15 années suivant l'apparition de la pathologie. Par ailleurs, les facteurs alimentaires interfèrent avec le développement de la DMLA et du T2D. Considérant l'épidémie mondiale de T2D d'une part, et l'allongement de l'espérance de vie d'autre part, les dépenses médico-sociales relatives à la prise en charge des patients atteints de T2D ou de DMLA sont à même de devenir un enjeu socioéconomique majeur. Le syndrome métabolique (SMet) est un des principaux facteurs de risque du T2D. Il peut ainsi être suggéré que limiter le développement du SMet pourrait potentiellement limiter l'incidence du T2D et de ses complications. Dans ce contexte, la consommation d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) de type oméga 3 fait partie des recommandations nutritionnelles pour la population afin de prévenir l'apparition du SMet et du T2D. Par ailleurs, une alimentation riche en AGPI-LC omega-3 est également associée à la réduction du risque de DMLA. En revanche, l'association entre T2D, RD et DMLA reste controversée, bien que quelques études basées sur des grandes cohortes rapportent une prévalence de DMLA augmentée chez les patients atteints de diabète ou de RD.

Nos objectifs ont été d'évaluer premièrement si un SMet constituait un environnement favorable au développement des complications de type néovasculaires dans la rétine, et de tester secondairement l'efficacité d'AGPI-LC omega-3 dans la réduction des conséquences de ce SMet sur la rétine.

Pour atteindre cet objectif, des rats ont été nourris avec un régime diabétogène enrichi en fructose afin de provoquer un SMet. Une néovascularisation choroïdienne a ensuite été induite en

utilisant un modèle d'impacts laser au fond d'œil. Nous nous sommes intéressés tout d'abord à l'effet de ce régime à court terme et avons mis en évidence une diminution de la sensibilité des photorécepteurs de type cônes après 8 jours de régime, ainsi qu'une modification de l'expression des gènes et en particulier des sous-familles de cristallines. Ensuite, nos études se sont portées sur les effets de régime enrichi en fructose à long terme jusqu'à 6 mois. Le développement d'un SMet a été illustré par une augmentation de la masse grasse, une hyperinsulinémie, une hyperleptinémie et l'installation d'une stéatose hépatique. Ces rats ont développé une néovascularisation choroïdienne exacerbée après 1 et 3 mois de régime associée à une surexpression de facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF et leptine. Une infiltration de macrophages dans la rétine et/ou l'activation des cellules microgliales résidentes a également été détectée. Les données électrorétinographiques ont suggéré une diminution de la sensibilité des photorécepteurs de type bâtonnets ainsi qu'une altération des fonctionnalités des cellules de la rétine interne à 6 mois. Dans un second temps, l'efficacité des AGPI-LC omega-3 (EPA+DHA) dans le but de réduire les conséquences du SMet dans la rétine a été testée. Nos données mettent en évidence qu'une forte dose d'EPA+DHA n'a cependant pas amélioré le SMet chez le rat. Au contraire, des effets délétères ont été observés, incluant une augmentation de masse grasse ainsi qu'une atrophie de la rétine en condition de néovascularisation choroïdienne.

Ce travail nous a permis de mettre en évidence que le SMet constituerait un environnement favorable au développement de complications néovasculaires dans la rétine. Par ailleurs, la sensibilité des cônes et des bâtonnets a été altérée par le SMet. Considérant les effets délétères des omega-3 dans la rétine que nous avons mis en évidence, des précautions doivent être prises quant à recommander une supplémentation en AGPI-LC omega-3 à des doses importantes dans le cadre d'un SMet.

Abstract

The retina is the association of the neurosensory tissue and the retinal pigment epithelium (RPE). Despite the presence of the blood retinal barrier, the retina is submitted to changes of the external milieu, including dietary modulation and environmental stresses. With advanced age, the exchanges of nutrients and elimination of cellular and metabolic wastes via the RPE become limited. Age-related Macular Degeneration (AMD) and Diabetic Retinopathy (DR) are the most prevalent retinal pathologies in Western adult populations before and after the age of 50 years, respectively. Geographic atrophy and neovascular AMD are advanced stages of age-related maculopathies. DR afflicts 60% of type 2 diabetic (T2D) patients in the first 15 years of the disease. Dietary factors interfere in the development of both AMD and T2D. Accounting the worldwide epidemics of T2D in the one hand, and the improvement of life expectancy in the other hand, medical care to the patients is expected to worsen the socioeconomic burden of both T2D and AMD. Metabolic syndrome (MetS) is one of the major risk factor for T2D. Lowering the development of MetS would potentially lessen the incidence of T2D, and its complications. The daily intake of omega 3 long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) is now recommended by health agencies for the prevention of MetS. Meanwhile dietary omega 3 LC-PUFA are associated with reduced risk of AMD. The association between T2D, DR, and AMD remains controversial, although large-scale population-based studies have reported increased prevalence of AMD in patients with diabetes or DR.

Our objectives were first to evaluate whether MetS would represent a favorable environment for the development of neovascular complications in the retina, and second to test the efficacy of omega 3 LC-PUFA to reduce the consequences of MetS in the retina.

For that purpose, a pro-diabetogenic high fructose diet was fed to rats to induce MetS and choroidal neovascularization was triggered by laser impacts in the eye fundus. We focused first on short term diet periods, and showed impairment on cone photoreceptor sensitivity after 8 days, as well as changes in gene expression in relation to crystallin sub-families. A long term - up to 6 months - fructose diet period triggered MetS as illustrated by body fat increase, hyperinsulinemia, hyperleptinemia and liver steatosis. Rats exhibited exacerbated laser-induced choroidal neovascularization after 1 and 3 months of feeding, that was associated with up-regulation of

genes coding pro-angiogenic factors such as VEGF and leptin, as well as infiltration of macrophages and/or activation of retinal microglia. Electroretinographic data showed decreased sensitivity of rod photoreceptors and inner retinal cell functionality at 6 months of feeding. In a second time, the efficacy of dietary omega 3 LC-PUFA (EPA plus DHA) to reduce the consequences of MetS in the retina was tested. Our data showed that a high dose of EPA+DHA in rats did not improve MetS. Furthermore, side effects were generated as illustrated by localized atrophy in the retina submitted to the combination of laser-impacts, and normal light exposure.

These works allowed us to suggest that MetS generated a favorable environment in the retina for the development of neovascular complications. Meanwhile, the sensitivity of cones and rods was impaired by MetS. Accounting the deleterious long term effects of omega 3 LC-PUFA in the retina, caution may be taken while recommending massive supplementation with omega 3 LC-PUFA in the context of MetS.

Introduction Générale

Le syndrome métabolique, représente aujourd'hui un enjeu majeur de santé publique. Il est lié au vieillissement des populations et à l'évolution des modes de vie. Il suscite un intérêt croissant auprès de la communauté scientifique et n'en demeure pas moins une pathologie asymptomatique, dont les mécanismes physiopathologiques et les conséquences ne sont pas encore clairement élucidés. Il est caractérisé par des anomalies morphologiques, physiologiques et biologiques en conjonction avec des troubles d'origine lipidique, glucidique et vasculaire. Le plus souvent, il est associé à une surcharge pondérale agissant en synergie avec les troubles mentionnés précédemment et constitue alors un facteur de risque majeur d'apparition du diabète de type 2. Depuis sa caractérisation par Reaven (Reaven, 1988), l'insulinorésistance fut pointée du doigt comme l'anomalie physiopathologique la plus associée à ce syndrome.

La prévalence du diabète ne cesse de croître, elle affectait 9.3% d'américains en 2012 et 4.4% de la population française en 2010 selon l'Association Française des Diabétiques (<http://www.afd.asso.fr/>).

Parmi les patients atteints de diabète de type 2, 28% sont susceptibles de développer une rétinopathie diabétique dans les 9 années suivant le diagnostic du diabète et 9% une maculopathie diabétique (Martín-Merino et al., 2014), l'insulinorésistance constituant un terrain favorable à l'installation de complications de type microvasculaires.

D'après l'organisation mondiale de la santé, 285 millions de personnes souffrent de déficience visuelle dans le monde (<http://www.who.int>). Dans les pays industrialisés, les pathologies rétiniennes telles que la rétinopathie diabétique (RD) et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) sont les premières causes de cécité ou de malvoyance (Congdon et al., 2003)(Klein et al., 1992a). Un point commun à ces pathologies est le développement de complications vasculaires qui contribuent largement à l'état de cécité dans les stades ultimes.

L'effet des lipides alimentaires et en particulier des AGPI-LC sur les phénomènes de vascularisation pathologique sont aujourd'hui reconnus. De nombreuses études épidémiologiques rapportent le potentiel effet protecteur d'un régime alimentaire riche en AGPI-LC de type oméga 3 sur l'apparition des complications vasculaires au cours de la DMLA (Cho et al., 2001a), des études menées en laboratoire rapportent également un potentiel effet des n-3 dans la prévention de l'angiogénèse induite chez le modèle rongeur (Connor et al., 2007).

Ces données nous ont amené à suggérer qu'une insulino-résistance et plus généralement un syndrome métabolique serait susceptible de conduire à des complications vasculaires et fonctionnelles dans la rétine. Nous avons par conséquent testé ces hypothèses chez le rat en le nourrissant avec un régime diabéto-gène. Enfin, le potentiel effet protecteur d'AGPI-LC de type oméga 3 sur la régression de ces complications a été investigué.

Le contexte bibliographique et ces travaux de thèse sont présentés dans ce manuscrit sous la forme de 6 chapitres.

Le premier chapitre sera consacré dans sa première partie à des rappels anatomiques et fonctionnels de l'œil et de la rétine. Sa seconde partie sera destinée au syndrome métabolique et à ses différentes conséquences pathologiques. Sa troisième partie sera consacrée à la description des AGPI-LC de type oméga 3 et à leurs implications éventuelles sur le syndrome métabolique et les pathologies rétinien-nes.

Les trois chapitres suivants présenteront les articles issus des trois études réalisées.

Ces 3 études ont été menées chez un modèle de rat commun, le rat Brown Norway. Les deux premières études constituaient le premier axe de recherche de ma thèse et avaient pour but de caractériser l'adaptation de la rétine face à un régime diabéto-gène enrichi en fructose, connu pour induire une insulino-résistance et plus généralement un syndrome métabolique. Le 2^{ème} axe de recherche constituant la 3^{ème} étude s'intéressait à la modulation de la réponse de la rétine face aux stress nutritionnels par une approche nutritionnelle à l'aide d'un enrichissement en AGPI-LC de type oméga 3.

Le second chapitre constituera la première étude. Elle présente les effets d'un régime enrichi en fructose, à court terme (3 et 8 jours) dans la rétine, se focalisant ainsi sur les conséquences transcriptionnelles et fonctionnelles bien avant que le stade d'insulino-résistance ne soit installé.

Le troisième chapitre constituera la deuxième étude. Cette étude s'installe dans les mêmes conditions que précédemment mais cette fois-ci, elle fut réalisée à long terme (1, 3, 6 mois). Elle avait pour but de caractériser véritablement le modèle de syndrome métabolique utilisé et de s'intéresser à l'évolution des complications néovasculaires, fonctionnelles et transcriptionnelles dans la rétine.

Suite au modèle de syndrome métabolique caractérisé précédemment et aux différentes conséquences observées, la dernière étude, constituant le quatrième chapitre, s'est intéressée à tester l'effet protecteur d'un enrichissement en AGPI-LC oméga 3. Différentes durées de régime (15 jours, 21 jours, 1 mois, 3 mois) ont été considérées. Cet effet a été testé d'une part d'un point de vue physiologique général prenant en compte les diverses composantes du syndrome métabolique. D'autre part, l'effet des oméga 3 a été testé d'un point de vue spécifique, dans la rétine, en se focalisant sur les complications néovasculaires et fonctionnelles.

Le cinquième chapitre sera consacré à une discussion générale des résultats obtenus au cours de ces études, des potentiels questionnements et implications cliniques qu'ils peuvent susciter et des perspectives de ces travaux.

Le sixième chapitre récapitulera l'ensemble des références bibliographiques détaillées dans ce manuscrit.

Chapitre 1

Contexte bibliographique

I- Anatomie et physiologie de l'œil et de la rétine

L'œil est l'organe sensoriel de la vision, il permet avant tout aux êtres vivants de traiter l'information lumineuse sous forme de signal chimique et de le convertir en signal électrique. Ce signal est ensuite analysé au niveau cérébral dans le but d'interagir et d'appréhender au mieux leur environnement.

L'œil humain, comme celui de la plupart des vertébrés, est logé au sein d'une cavité osseuse appelée orbite, protégée par les paupières. Les muscles oculomoteurs assurent sa mobilité et les glandes lacrymales son hydratation. Il est constitué de trois enveloppes ou tuniques : la tunique externe ou sclérotique, la tunique moyenne ou tunique uvéale et la tunique interne ou nerveuse. Ces trois tuniques sont hétérogènes et opaques, exceptée la partie antérieure de la tunique externe qui constitue la cornée. L'acheminement des rayons lumineux vers la rétine est garanti par la présence de milieux transparents et homogènes, dans un axe antéro-postérieur : l'humeur aqueuse, le cristallin puis le corps vitré.

L'humeur aqueuse est un liquide transparent sécrété par les procès ciliaires. Elle participe au maintien de la pression intraoculaire et à la forme du globe oculaire. Après avoir gagné la chambre antérieure de l'œil qu'elle remplit, l'humeur aqueuse est résorbée au niveau de l'angle irido-cornéen par le trabeculum puis le canal de Schlemm qui se jette dans les veines épisclérales.

Le cristallin est une lentille transparente à l'état physiologique, biconvexe, avasculaire, reliée aux procès ciliaires par la zonule de Zinn (en arrière), et à la hyaloïde antérieure par le ligament de Wieger. Le cristallin est également constitué d'un noyau, de fibres cristalliniennes et d'une capsule antérieure appelée cristalloïde. Il participe au phénomène d'accommodation grâce à la modification de son rayon de courbure assurée par le muscle ciliaire.

Enfin la cavité vitrénne est occupée par le corps vitré. Il s'agit d'un gel transparent, visqueux presque acellulaire limité en avant par la hyaloïde antérieure qui tapisse la face postérieure du cristallin et la hyaloïde postérieure qui tapisse la face interne de la rétine (*Figure 1*).

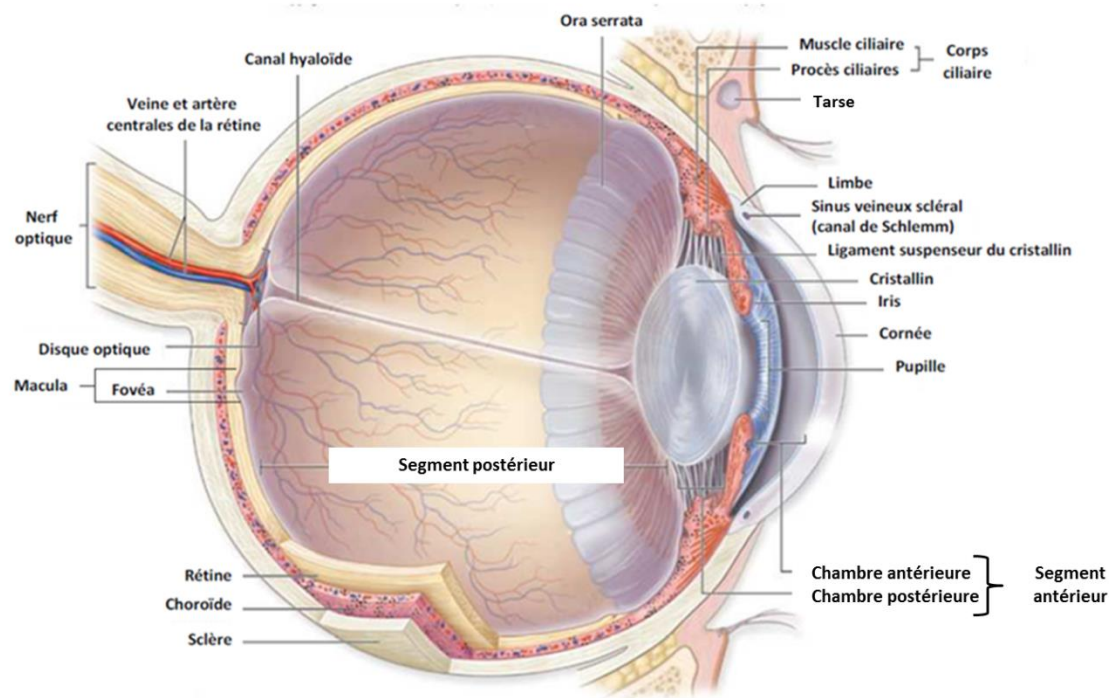


Figure 1 : Représentation horizontale sagittale d'une coupe d'œil humain

Adapté de the McGraw hill Companies, Inc.

I.1 Le globe oculaire

I.1.1 La tunique sclérale

La tunique externe ou sclérotique est une membrane fibreuse, résistante, qui entoure et qui assure une protection mécanique à l'œil tout en lui conférant forme et rigidité. Elle est composée à l'avant de la cornée et à l'arrière de la sclère (*Figure 1*). D'une part, la cornée est une calotte de sphère transparente, avasculaire et richement innervée. Elle est essentiellement constituée de collagène, d'eau et de cellules qui se répartissent en 5 couches de la superficie à la profondeur : l'épithélium, la membrane de Bowman, le stroma cornéen, la membrane de Descemet et l'endothélium. Elle est insérée au niveau de l'ouverture antérieure de la sclère. Elle constitue la lentille principale du système optique oculaire. D'autre part, la sclère est une membrane résistante, blanchâtre et inextensible qui garantit à l'œil sa forme globulaire. Elle est constituée d'un tissu conjonctif peu innervé et peu vascularisé où s'insèrent les muscles oculomoteurs. Elle

présente à l'arrière une ouverture dénommée canal scléral regroupant les différentes fibres du nerf optique (papille), la veine centrale de la rétine et l'artère centrale de la rétine. La jonction entre la sclère et la cornée est appelée le limbe ; il s'agit d'une zone semi-transparente qui a la particularité d'être richement innervée et vascularisée. La conjonctive quant à elle, est une fine muqueuse transparente composée de la conjonctive bulbaire d'une part, qui recouvre la partie antérieure de l'œil exceptée la cornée ; et de la conjonctive palpébrale ou tarsale d'autre part, qui recouvre la partie postérieure des paupières supérieures et inférieures. Dans le limbe cornéo-scléral, au niveau de l'angle irido-cornéen, des structures appelées canaux de Schlemm et trabéculum, interviennent dans la régulation de la pression intra-oculaire, permettant notamment l'évacuation de l'humeur aqueuse depuis la chambre antérieure.

I.1.2 La tunique uvéale

La tunique moyenne ou uvéale, se compose au niveau de la face antérieure : de l'iris et du corps ciliaire et au niveau de la face postérieure de la choroïde (*Figure 1*).

L'iris est une membrane circulaire et contractile, elle est située dans l'humeur aqueuse entre la cornée et le cristallin. Il s'agit d'une structure pigmentée conférant à l'œil sa couleur. Il est percé en son centre d'un orifice appelé pupille. La contraction ou la dilatation de l'iris est un réflexe physiologique permettant de contrôler le degré d'illumination de la rétine par l'intermédiaire du tonus de deux muscles antagonistes : le sphincter irien (sous contrôle du système parasympathique) et le dilatateur (sous contrôle du système sympathique). Une luminosité réduite entraîne ainsi un relâchement du muscle sphincter et une contraction du muscle dilatateur, on parle alors de mydriase. Réciproquement une luminosité intense conduira à une contraction du muscle sphincter et donc à une contraction de l'iris, on parle ainsi de myosis, apparentant finalement l'iris à une forme de diaphragme.

Le corps ciliaire est composé d'une part du muscle ciliaire, relié par la zonule de Zinn au cristallin et qui par ses contractions modifie la forme de la lentille, et d'autre part des procès ciliaires, sécrétant l'humeur aqueuse. Avec l'iris, le corps ciliaire forme l'uvée antérieure.

La choroïde, considérée comme la partie postérieure de l'uvée est une membrane tapissant l'intérieur du globe et jouant un rôle dans la nutrition de la rétine par l'intermédiaire de sa vascularisation en réseau. Elle apporte ainsi oxygène et nutriments aux cellules de la rétine

externe et permet également l'évacuation des métabolites de cette dernière. La présence de la mélanine confère une pigmentation à la choroïde, limitant ainsi la réflexion des rayons lumineux sur la face interne de la sclère.

I.1.3 La tunique nerveuse

La tunique nerveuse ou rétine tapisse les deux tiers de la surface du globe postérieur. Son rôle est de recevoir la lumière et de transmettre les informations visuelles au cerveau, au niveau du cortex occipital, via le nerf optique.

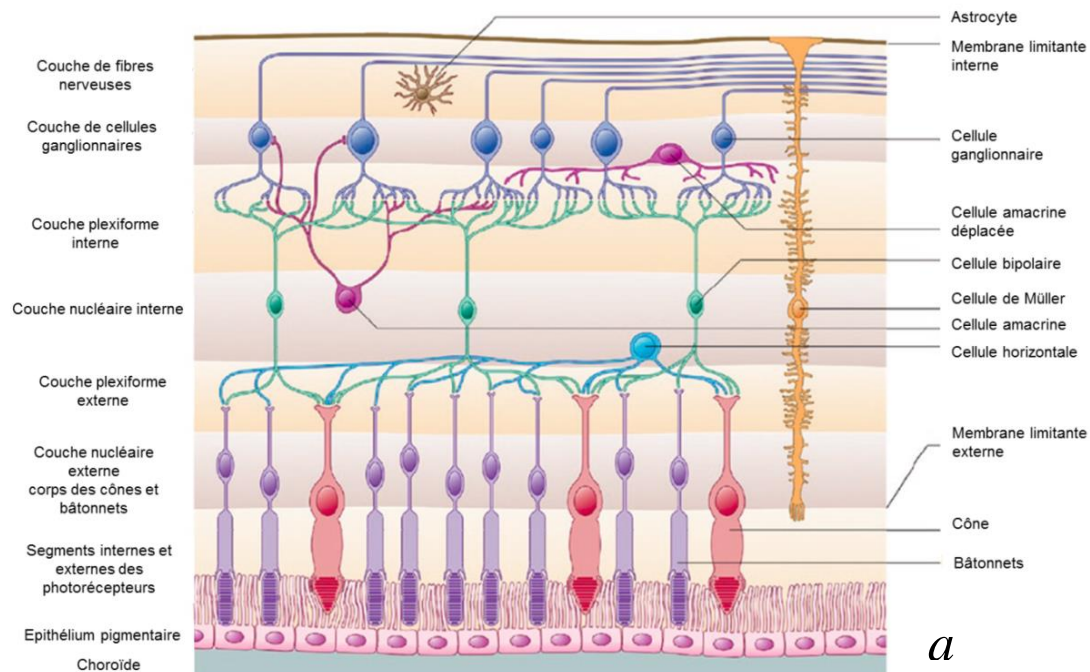
Elle est formée de deux couches : l'épithélium pigmentaire (EPR) et la rétine neurosensorielle ou neurale.

L'EPR est constitué d'une monocouche de cellules épithéliales qui reposent sur la membrane de Bruch. L'EPR est ainsi la couche externe de la rétine qui est en contact avec la face postérieure de la choroïde. L'EPR se caractérise notamment par la présence de mélanosomes impliqués dans la synthèse et le stockage des pigments de mélanine.

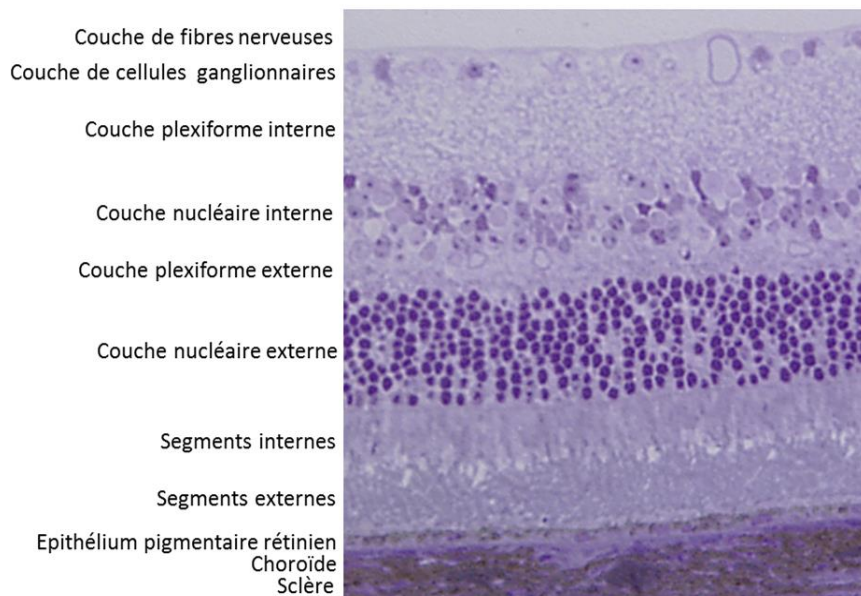
La rétine neurale ou neurorétine est une unité fonctionnelle du système nerveux central (SNC) qui permet la conversion d'un signal lumineux en un influx nerveux. Tissu d'origine neuroectodermique dérivé du diencephale, la rétine neurale est stratifiée et composée de cinq types de cellules neurales (les cellules photoréceptrices dénommées cônes et bâtonnets, les cellules horizontales, les cellules bipolaires, les cellules amacrines, et les cellules ganglionnaires) et de trois types de cellules gliales (cellules gliales de Müller, astrocytes et cellules microgliales). L'ensemble de ces types cellulaires sont tous issus des mêmes progéniteurs neuronaux. La neurorétine est ainsi définie en couches de noyaux cellulaires alternant avec des couches de synapses et des prolongements de cellules gliales. Parmi les différentes couches cellulaires, nous distinguons (*Figure 2*) :

- la couche la plus externe comprenant les segments externes et internes des photorécepteurs,
- la couche nucléaire externe, exclusivement composée des corps cellulaires des photorécepteurs,

- la couche plexiforme externe, lieu de formation des connexions synaptiques entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires,
- la couche nucléaire interne, composée de noyaux de trois types de neurones ; les cellules horizontales, bipolaires et amacrines ainsi que par les noyaux des cellules gliales de Müller,
- la couche plexiforme interne, lieu de formation des connexions synaptiques entre les axones des cellules bipolaires et les dendrites des cellules ganglionnaires,
- la couche des noyaux des cellules ganglionnaires, la plus interne,
- la couche des fibres nerveuses constituée des axones des cellules ganglionnaires.



a



b

Figure 2 : Anatomie de la rétine

2a : Représentation schématisique de l'anatomie de la rétine, adapté de Gray's anatomy.

2b : Image en microscopie électronique d'une coupe semi fine de rétine de souris adulte, coloration hématoxyline, source CSGA.

I.1.3.1 L'épithélium pigmentaire rétinien

L'EPR riche en mélanine, constitue la couche pigmentée de la rétine. Il s'agit d'un élément majeur dans la rétine, tout d'abord par ses propriétés physiques de barrière hématorétinienne, mais surtout en raison de ses nombreuses fonctions métaboliques. Sa position stratégique entre les photorécepteurs et la choriocapillaire ainsi que son intégrité sont fondamentales pour un fonctionnement normal de la rétine et en particulier des photorécepteurs.

L'EPR est tout d'abord responsable de l'adhésion de la rétine neural de par l'interdigitation de ses villosités avec les photorécepteurs. Il est aussi directement impliqué dans la fonction visuelle en raison de son activité métabolique dans le phénomène de transduction visuelle, mais aussi dans la phagocytose des segments externes « usagés » des photorécepteurs. L'EPR possède à ce titre des villosités nécessaires à cette phagocytose et des phagosomes au niveau apical. Chaque cellule de l'EPR participe au renouvellement des articles externe de 30 à 40 photorécepteurs. Sa capacité de phagocytose est telle qu'elle permet un renouvellement total des articles externes des bâtonnets en 10 jours chez l'homme, ce taux de renouvellement est cependant plus long pour les cônes. Ce processus présente un rythme circadien : le pic de phagocytose des disques intervenant le matin (Yao et al., 2014).

L'EPR est également le site de synthèse et de stockage de nombreux facteurs de croissance tels que FGF, VEGF, TGF β , ce qui lui permet donc d'interagir avec les types cellulaires avoisinants (Kliffen et al., 1997).

Les cellules de l'EPR sont de forme hexagonale, au nombre de 4 à 6 millions, leur densité varie avec l'âge et leur localisation périphérique ou maculaire. Au niveau du pôle postérieur elles sont hautes (14 μ m) et longues (10-14 μ m) alors qu'au niveau de l'ora serrata (frontière entre la partie ciliaire de la rétine et la partie optique de la rétine), elles sont plus plates et plus larges (60 μ m). Certaines peuvent être binucléées. Celles-ci sont en moyenne en contact avec 30 à 45 segments externes de photorécepteurs. La liaison des cellules entre elles s'effectuent par des jonctions serrées limitant notamment les échanges de nutriments solubles à l'eau et à certains métabolites entre la choroïde et l'espace sous rétinien.

Au sein de ces cellules épithéliales, nous retrouvons deux types de grains de pigments principaux : la mélanine et la lipofuscine. La mélanine est située au pôle apical de la cellule

permettant notamment l'absorption de l'excès de photons. La lipofuscine quant à elle se situe dans la portion basale et centrale de la cellule. Elle apparaît sous forme de grains qui s'accumulent avec l'âge.

L'EPR joue enfin un rôle important dans le stockage et le métabolisme de la vitamine A et de ses composés apparentés, les rétinoïdes. Il intervient enfin dans la régénération des pigments visuels.

I.1.3.2 La rétine neurale

I.1.3.2.1 Anatomie macroscopique

La rétine est une fine tunique transparente, laissant apparaître la vascularisation choroïdienne. C'est cette transparence qui donne son aspect rose-orangé au fond d'œil. La rétine est un tissu dont l'épaisseur est inférieure à 500 μm chez l'homme et varie en fonction de sa localisation. Ainsi la rétine nasale est légèrement plus épaisse que la rétine temporale (impliquant ainsi une densité de bâtonnets plus importante en position nasale). En extrême périphérie, l'épaisseur rétinienne est environ de 100 μm puis s'épaissit à 180-240 μm jusqu'à l'aire maculaire où la rétine est la plus épaisse avoisinant les 500 μm . L'épaisseur minimale de la rétine se trouve au niveau de la fovéa (zone centrale de la macula) où elle mesure 130 μm .

➤ *Ora serrata*

La rétine couvre environ 15-16 mm du diamètre interne de l'œil et 72 % de la surface de la sphère oculaire. Elle s'étend de l'ora serrata en avant jusqu'au nerf optique au pôle postérieur du globe oculaire. L'ora serrata est la zone où la limite antérieure de la rétine se trouve être en continuité avec l'épithélium non pigmenté de la pars plana, une portion du corps ciliaire. Dans cette zone spécifique, les bâtonnets sont absents, les cônes présentent quant à eux une morphologie altérée par rapport aux cônes réiniens.

➤ *Papille optique*

La tête du nerf optique est visible macroscopiquement sous forme d'un disque, la papille optique. Elle est à l'émergence des artères et veines réiniennes, de couleur rosée plus claire que la rétine. Son diamètre est variable en moyenne de 1,9 mm dans son axe vertical et 1,7 mm dans son axe horizontal, sa surface moyenne est de 2,7 mm^2 .

➤ *Zones anatomiques rétiniennes distinctes*

La macula est une zone de la rétine postérieure qui mesure 5,5 mm de diamètre et dont le centre est situé à 4 mm en temporal et 0,8 mm inférieurement au centre de la papille. On repère assez distinctement cette zone par la présence d'un pigment jaunâtre et par la raréfaction de vaisseaux rétiniens en son centre. Subdivisée en plusieurs zones concentriques, le centre de celle-ci forme une dépression, on parle de fovéa. Il s'agit de la zone la plus mince de la rétine, elle est très riche en cônes et dispose de la densité en pigment maculaire la plus élevée (constitué notamment de lutéine et zéaxanthine). Le pigment maculaire dispose d'un rôle de filtre des UV et de fonctions antioxydantes permettant d'une part de lutter contre les rayonnements bleus responsables des atteintes oxydatives rétiniennes et d'autre part d'intervenir contre les radicaux libres au niveau des photorécepteurs (Cruickshanks et al., 1993). Le pigment maculaire n'est cependant pas restreint à la fovéa, une distribution spatiale a récemment été identifiée. A ce niveau, le pigment maculaire est principalement situé au niveau des fibres de Henle, alors qu'autour de la fovéa il est principalement retrouvé au niveau des couches plexiformes internes et externes (Trieschmann et al., 2008). Cette zone caractérisée de parafovéolaire est une zone de 500 μm de diamètre qui correspond à la région où la rétine est la plus épaisse du fait d'une grande densité de cellules ganglionnaires, de la nucléaire interne et de la couche des fibres de Henle. Enfin la dernière zone concentrique, la plus externe correspond à une zone justifiant d'un amincissement de la rétine, on parle de zone périfovéolaire (*Figure 3*).

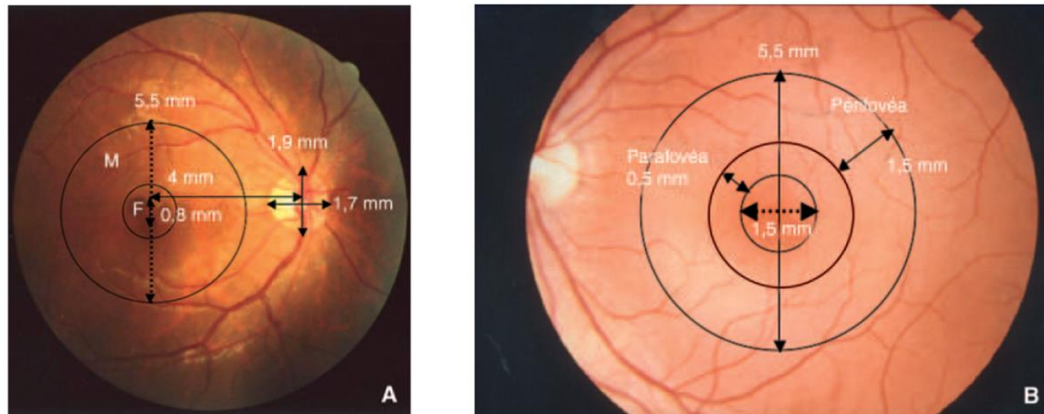


Figure 3 : Photographies du fond d'œil avec repères anatomiques et dimensions des différentes zones rétinienne

A : Photographie d'un fond d'œil droit. M : macula, F : fovéa

B : Photographie d'un fond d'œil gauche

D'après EMC d'ophtalmologie © Elsevier Masson SAS.

I.1.3.2.2 Anatomie microscopique

Fonctionnellement parlant, la rétine neurale peut-être subdivisée en deux parties : d'une part les cellules photoréceptrices permettant la transformation de l'énergie lumineuse en un signal électrique (transduction visuelle), et d'autre part, la rétine interne permettant le traitement partiel de ce signal et sa transmission jusqu'au niveau des aires cérébrales visuelles du cortex occipital via le nerf optique.

➤ *Les cellules photoréceptrices*

Il existe deux types de photorécepteurs : les cônes et les bâtonnets, se distinguant par de nombreuses caractéristiques autant anatomiques que fonctionnelles. Ils sont formés de quatre parties : un segment externe, un segment interne, un corps cellulaire et une terminaison synaptique (*Figure 4*). Dans le cas des bâtonnets, le segment externe est formé d'un empilement

de disques enchâssés dans le cytoplasme de la cellule, alors que les disques des cônes sont formés par le repliement de la membrane plasmique. La forme du segment externe permet de distinguer alors les deux grands types de photorécepteurs : les bâtonnets présentent un long segment externe cylindrique avec de nombreux disques, les rendant relativement sensibles à la lumière tandis que les cônes ont un segment externe plus court et effilé. Les bâtonnets sont essentiellement destinés à la vision périphérique, des formes, crépusculaire et nocturne, on parle de vision scotopique, alors que les cônes situés essentiellement au niveau maculaire sont destinés à la vision de près, des couleurs, de jour, on parle de vision photopique. La répartition des photorécepteurs n'est pas homogène sur toute la rétine. La macula lutea est en effet caractérisée par une concentration maximale de cônes, la fovéa étant la zone la plus riche, il s'agit d'une zone d'acuité visuelle maximale, elle permet une vision précise des détails et des couleurs en conditions diurnes.

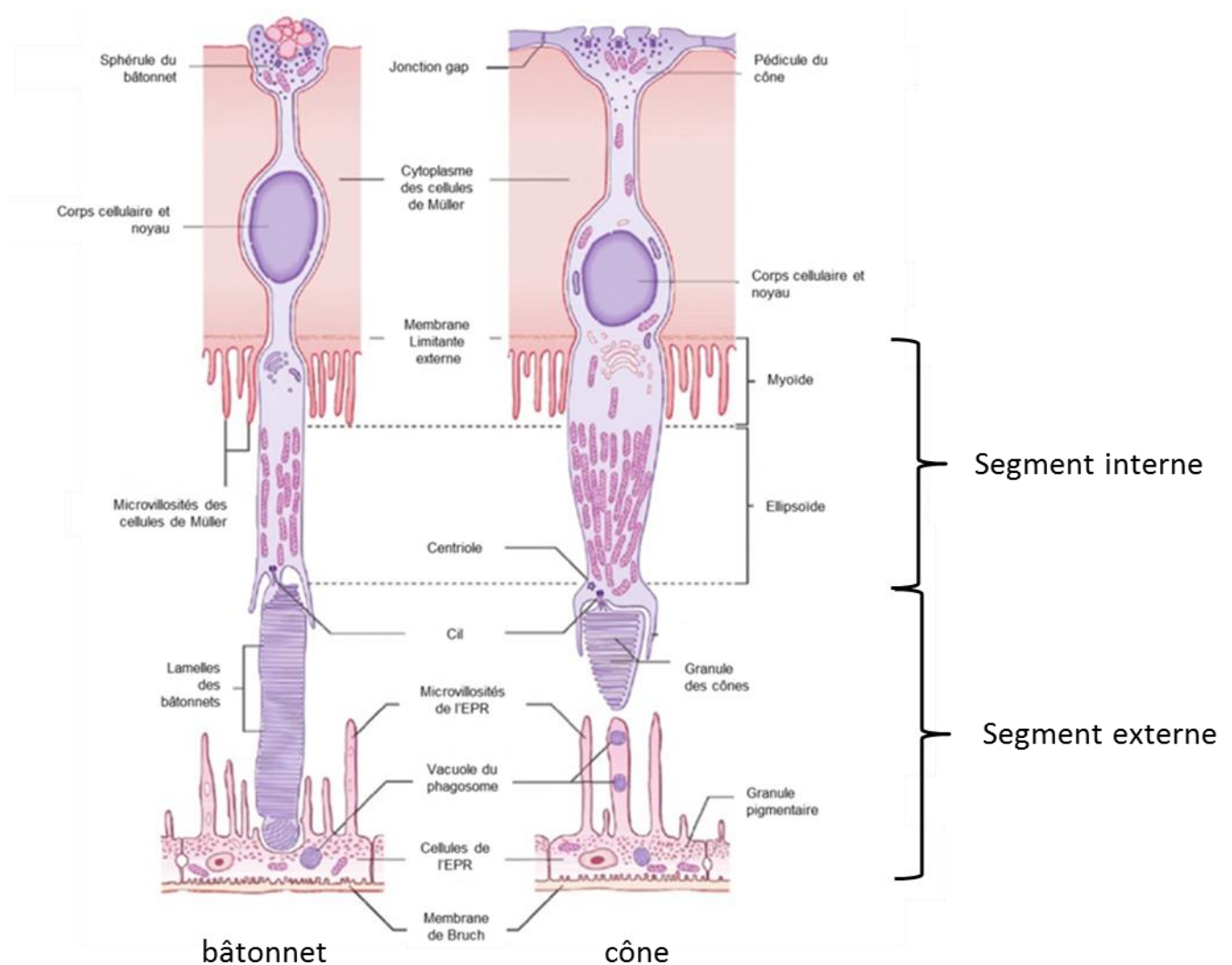


Figure 4 : La structure des cônes et des bâtonnets

EPR : Epithélium pigmentaire rétinien

Adapté de Gray's anatomy

- La transduction visuelle

C'est également au niveau du segment externe des photorécepteurs que se trouvent enchâssés des pigments sensibles à la lumière. Dans le cas des bâtonnets, ce pigment photosensible s'appelle la rhodopsine et présente un pic de sensibilité des photons à une longueur d'onde d'environ 500 nm. Les cônes quant à eux, contiennent trois variétés d'opsine, une protéine transmembranaire très proche de la rhodopsine variant au niveau de leur séquence en acides

aminés. Ces trois variétés d'opsine déterminent trois types de cônes présentant une sensibilité dans le spectre d'absorption de la lumière visible différente. Ainsi Les cônes « bleus » ou S sont principalement activés par une longueur d'onde d'environ 420 nm, les cônes « verts » ou M autour de 530 nm, et les cônes « rouges » ou L près de 560 nm.

La transduction visuelle a pour but de convertir l'énergie lumineuse en un signal électrique, elle est permise par l'activation de ces photopigments par les photons. Ces photopigments appartiennent à la famille des opsines. Dans le cas de la rhodopsine, une molécule dérivée de la vitamine A, appelée 11 cis retinal , est logée au sein des sept domaines transmembranaires du photopigment. Lorsque cette molécule absorbe la lumière, le 11 cis retinal subit alors un changement de conformation appelé isomérisation vers la forme « tout-trans » transformant ainsi la molécule de rhodopsine en sa forme active, la métarhodopsine II.

Cette dernière permet l'activation d'une protéine G appelée transducine. La sous-unité $T\alpha$ de la transducine se dissocie alors de ses sous-unités $T\beta\gamma$ et de la rhodopsine. Cette sous-unité $T\alpha$ va activer la phosphodiesterase qui hydrolyse le GMP cyclique (GMPc), entraînant la dissociation de ce dernier du canal à sodium-calcium de la membrane plasmique et provoquant la fermeture de ce port. Ces modifications des concentrations ioniques entraînent alors une modification du potentiel de membrane se traduisant par une hyperpolarisation du photorécepteur qui sera à l'origine de l'émission d'un signal nerveux vers les cellules de la rétine interne (*Figure 5*).

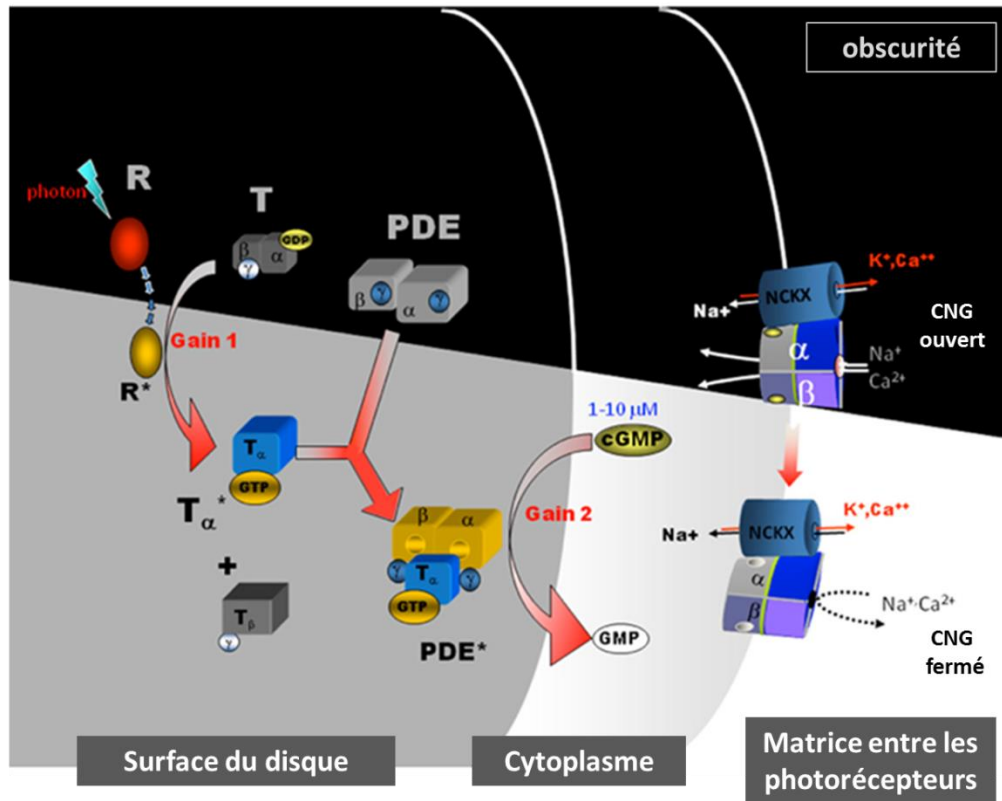


Figure 5 : Activation de la cascade de phototransduction des bâtonnets

R : rhodopsine inactive, *R** : rhodopsine inactive, *T* : transducine, *PDE* : phosphodiesterase inactive, *PDE** : phosphodiesterase active, *NCKX* : échangeur de Na/Ca,k, *CNG* : cyclic-nucleotide-gated channel

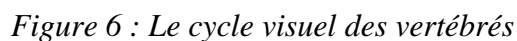
Adapté de Wolfgang Baehr, www.webvision.med.utha.edu.

- Le cycle visuel

Un processus séquentiel appelé "cycle visuel" permet le renouvellement de l'isomère 11-cis-rétinal isomérisé par les photons lumineux (Figure 6).

Formé par isomérisation du 11-cis-rétinal sous l'action des photons lumineux, le tout-trans-rétinal est réduit en tout-trans-rétinol au niveau des segments externes des bâtonnets. A ce niveau, le tout-trans-rétinol quitte alors le bâtonnet et diffuse jusqu'au niveau de l'EPR où il est séquentiellement estérifié et converti en 11-cis-rétinol par une isomérase spécifique, sous le

Le 11-cis-retinol est quant à lui oxydé en 11-cis-rétinal. Ce 11-cis-rétinal diffuse alors en retour vers les bâtonnets où il régénère la rhodopsine, ce qui termine ainsi le cycle visuel.



b : interface d'une cellule photoréceptrice de bâtonnet et de l'épithélium pigmentaire rétinien mettant en exergue les principales réactions impliquées dans le renouvellement du 11-ci- rétinol.

46

➤ *Couche plexiforme externe*

- Les cellules horizontales

Les cellules horizontales sont des cellules d'association. Trois variétés ont été identifiées dans la rétine humaine : les cellules HI, HII et HIII (Kolb et al., 1992) (Wässle et al., 2000). Ces cellules communiquent entre elles par de nombreuses jonctions gap. Elles ont pour rôle d'inhiber l'activité des cellules avoisinantes. Cette suppression sélective de certains signaux nerveux s'appelle l'inhibition latérale, son rôle général étant d'amplifier le signal sensoriel.

- Les cellules bipolaires

Les cellules bipolaires sont de disposition radiale et sont impliquées particulièrement dans la transmission du signal entre les cellules photoréceptrices et les cellules ganglionnaires. Leurs dendrites sont situées au niveau de la couche plexiforme externe et leurs axones se terminent au niveau de la couche plexiforme interne. Elles se répartissent en 2 sous-couches. La sous-couche a, la plus superficielle, est le lieu de terminaison des bipolaires qui font synapse par contacts superficiels avec les pédicules de cônes L et M. Elles s'hyperpolarisent lorsque les cônes L et/ou M sont stimulés. Ce sont les cellules bipolaires OFF. La sous-couche b, la plus profonde, est le lieu de terminaison des bipolaires qui font synapses par invaginations avec les bâtonnets et les cônes S, M et L. Elles se dépolarisent lorsque les photorécepteurs sont stimulés. Ce sont les bipolaires ON.

➤ *La couche plexiforme interne*

- Les cellules amacrines

Les cellules amacrines sont des cellules d'association situées entre les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires. Plus d'une vingtaine de cellules amacrines différentes ont été identifiées, elles sont réparties entre cellules glycinergiques et cellules GABAergiques (Wässle et al., 2009). Les mieux connues sont respectivement les cellules amacrines A17 et les cellules amacrines AII, un exemple de cellules bistratifiées qui assurent la connexion entre la voie des bâtonnets et les cellules ganglionnaires naines.

- Les cellules ganglionnaires

Les cellules ganglionnaires sont des cellules neuronales. Les cellules ganglionnaires sont en étroite relation avec les cellules bipolaires et les cellules amacrines. Au nombre d'environ 1,2 million chez l'homme, leurs axones se regroupent en un point nommé papille pour former le nerf optique avant de sortir du globe oculaire par la lamina cribrosa. Le nerf optique pénètre dans le crâne par le canal optique puis suit la gouttière optique, avant de rejoindre son homologue controlatéral pour former le chiasma optique au-dessus de l'hypophyse. Le chiasma se poursuit au niveau des tractus optiques qui contournent alors le mésencéphale avant de se terminer au niveau des corps géniculés latéraux.

Il existe trois types principaux de cellules ganglionnaires : les cellules ganglionnaires naines de type P1 ou P2 situées au niveau de la foveola et de la moyenne périphérie, elles représentent environ 90% de la population totale de cellules ganglionnaires. Les cellules ganglionnaires parasols sont présentes sur toute la rétine du centre jusqu'à la périphérie. Les cellules bistratifiées sont les moins nombreuses, leurs axones se projettent au niveau des voies koniocellulaires, elles apparaissent jouer un rôle important dans le transfert des informations qui code pour le canal bleu/jaune (Szmajda et al., 2008).

Une quinzaine d'autres types de cellules ganglionnaires ont été identifiées. Parmi elles, les cellules ganglionnaires dites luminosensibles ont été mises en évidence. Elles expriment spécifiquement un pigment la mélanopsine (Hannibal and Fahrenkrug, 2002) (Newman et al., 2003) et joueraient un rôle dans la régulation du rythme circadien et le réflexe pupillaire (Ramsey et al., 2013) (Semo et al., 2014).

- Les cellules gliales

Il existe trois types de cellules gliales dans la rétine : les cellules de Müller, les astrocytes et les cellules microgliales. Les cellules de Müller et les astrocytes participent au maintien de l'homéostasie de la rétine.

Les cellules microgliales représentent les principales cellules immunitaires résidentes de la rétine, en conditions non pathologiques (Hickey and Kimura, 1988) (Perry and Gordon, 1988), elles sont localisées dans la rétine interne. Dans un cadre physiopathologique comme la RD (Zeng et al.,

2008), la DMLA (Combadière et al., 2007a), l'uvéïte (Rao et al., 2003) ou simplement lors du vieillissement (Xu et al., 2008), les cellules microgliales et macrophages s'activent (van der Schaft et al., 1993) transformant des cellules quiescentes en cellules amiboïdes qui s'accumulent dans l'espace sous-rétinien (Gupta et al., 2003). La microglie activée migre alors vers les zones endommagées, dégradant les débris présents et sécrétant des cytokines et chimiokines pro inflammatoires (Langmann, 2007).

La migration et l'activation de ces cellules représentent le plus souvent une réponse à un stress non spécifique. Lors d'atteintes rétinienne induites par la lumière, la microglie résidente migre au travers de la couche des photorécepteurs où sont générés des facteurs comme le TNF α ou le NO, et cela avant que les macrophages circulants et les cellules nucléaires polymorphes aient infiltré le tissu oculaire (Rao et al., 2003). Les cytokines et médiateurs toxiques (tels que NO) sont libérés par la microglie activée et sont suspectés d'être neurotoxiques pour les cellules photoréceptrices (Xu et al., 2007) (Ma et al., 2009). Ces données suggèrent que l'activation microgliale peut contribuer à des altérations permanentes de la rétine. D'autre part, la microglie rétinienne peut sécréter l'interleukine 27 (IL-27), surexprimé en cas d'uvéïte ; sa signalisation induisant la production de molécules anti-inflammatoires par les cellules photoréceptrices telles qu'IL-10 (Interleukine 10) et le facteur SOCS1 (Suppressor of cytokin signalling 1). Ainsi en fonction de son statut d'activation, la microglie serait aussi susceptible de contrôler sa réponse inflammatoire (Lee et al., 2011).

I.2 Les réseaux vasculaires

La rétine est vascularisée par deux systèmes vasculaires ne disposant pas de connexions anatomiques. D'une part, le réseau capillaire rétinien assure la vascularisation directe des couches rétinienne internes. D'autre part, le réseau choroïdien assure la vascularisation de la rétine de manière indirecte via l'EPR (*Figure 7*).

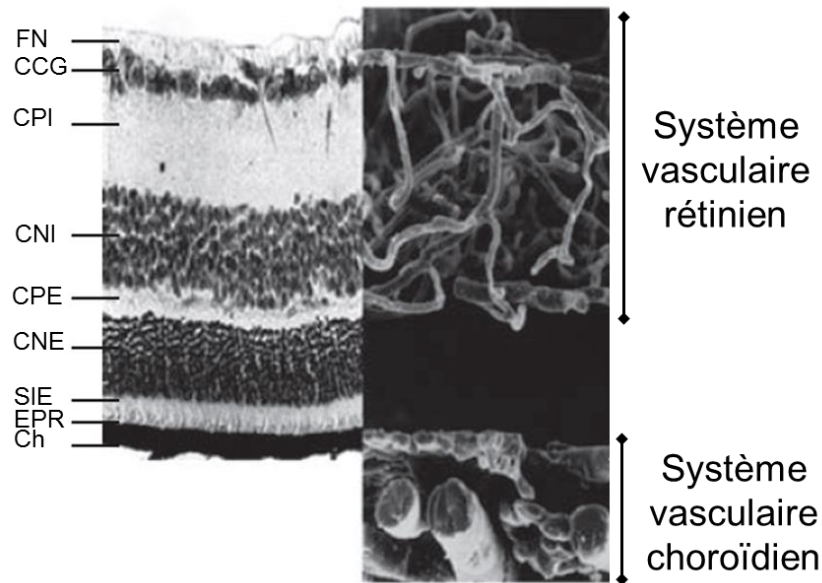


Figure 7 : Localisation des vaisseaux rétiniens et choroïdiens par rapport aux différentes couches rétinienne

Ch : choroïde, EPR : épithélium pigmentaire rétinien, SIE : segments internes et externes des photorécepteurs, CNE : couche nucléaire externe, CPE : couche plexiforme externe, CNI : couche nucléaire interne, CPI : couche plexiforme interne, CCG : couche des cellules ganglionnaires, FN : Couche de fibres nerveuses.

Adapté de l'EMC d'ophtalmologie © Elsevier Masson SAS

I.2.1 Le système vasculaire rétinien

Les artères et veines rétiniennes sont localisées dans la couche des fibres nerveuses (Figure 7). L'artère centrale de la rétine dérive primitivement de l'artère ophtalmique qui dérive elle-même de la carotide interne, son diamètre est compris entre 80 et 100 μm . La veine centrale de la rétine quant à elle, dispose d'un diamètre légèrement supérieur de 100 à 125 μm . L'artère rejoint le nerf optique situé à l'arrière du globe oculaire puis suit un trajet intra neural pour émerger au niveau de la papille où elle se subdivise en quatre branches terminales : temporale, nasale, supérieure et inférieure. Ces artères terminales se divisent alors en collatérales, lesquelles se subdivisent en terminales comportant des collatérales de manière dichotomique jusqu'à former un réseau couvrant un quadrant de la rétine interne pour chacune des artères. Le diamètre des artérioles

régresse au fur et à mesure de leurs divisions en périphérie où il atteint 10 à 20 μm . Elles présentent une membrane basale et une media commune aux artères et veines rétinienne. Les capillaires rétiens mesurant 5 à 6 μm de diamètre sont eux-mêmes issus de ces vaisseaux collatéraux. Ceux-ci disposent au niveau de leurs épaisses membranes basales d'une couche de cellules endothéliales à jonctions serrées ainsi que de péricytes et de cellules microgliales les entourant. Les capillaires sont organisés en une ou deux rangées en périphérie et en trois ou quatre rangées au niveau central de la rétine. A ce niveau, une zone de 850 μm de diamètre est dépourvue de capillaires rétiens, on parle alors de zone avasculaire centrale.

Le drainage rétinien est quant à lui assuré par la veine rétinienne qui se déverse dans la veine ophtalmique supérieure.

I.2.2 Le système vasculaire choroïdien

La choroïde est un tissu de 300 à 500 μm d'épaisseur chez l'homme, limité en avant par la membrane de Bruch et adhérente à la sclère en arrière. La vascularisation choroïdienne provient de branches de l'artère ophtalmique elle-même issue de branches de la carotide interne. Les artères permettant l'irrigation de la choroïde sont appelées artères ciliaires postérieures (nasale, temporale et supérieure) (*Figure 8*). Celles-ci se subdivisent en artères ciliaires longues et courtes, la pénétration sclérale des artères est située en arrière des veines vortiqueuses (*Figure 8*). La choroïde dispose de cellules pigmentées appelées mélanocytes et de 3 types de vaisseaux : les choriocapillaires, les vaisseaux moyens et les gros vaisseaux. Le débit choroïdien moyen est estimé à 800 mL/min et est considéré comme l'un des plus importants de l'organisme. Les capillaires choroïdiens mesurent entre 15 et 30 μm de diamètre soit 3 à 4 fois plus que des capillaires rétiens. Le système vasculaire choroïdien apporte les nutriments et l'oxygène nécessaire au bon fonctionnement de la rétine externe et en particulier les photorécepteurs, la rétine externe ne comportant pas de réseau capillaire nourricier.

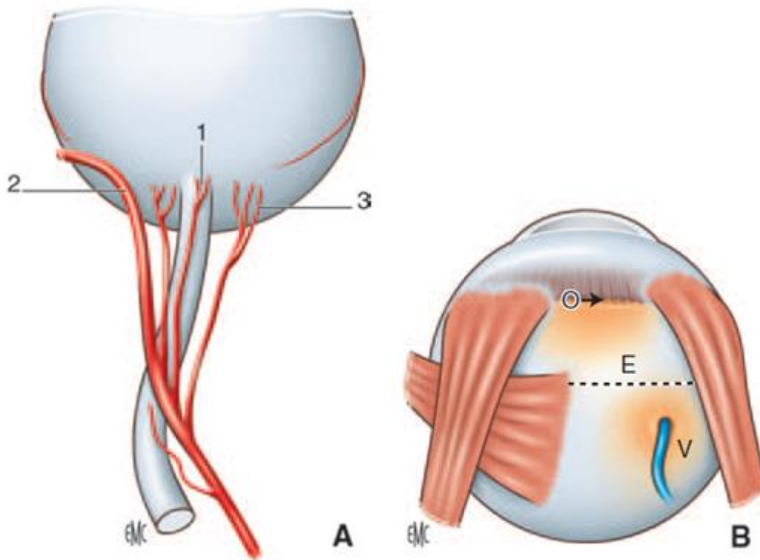


Figure 8 : Représentation schématique des vaisseaux choroïdiens (A) et des veines vortiqueuses (B)

A - 1 : artères ciliaires postérieures supérieures, 2 : artères ciliaires postérieures temporales, 3 : artères ciliaires postérieures nasales

B - O : ora serrata, E : équateur, V : veines vortiqueuses

Adapté de l'EMC d'ophtalmologie © Elsevier Masson SAS.

I.2.3 La barrière hémato-rétinienne

Les cellules rétiniennes sont isolées du système vasculaire par deux barrières hémato-rétiniennes : la barrière hémato-rétinienne interne formée par le réseau vasculaire rétinien et la barrière hémato-rétinienne externe formée par le réseau vasculaire choroïdien. La barrière hémato-rétinienne interne est constituée par les cellules endothéliales des vaisseaux rétiniens, la lame basale des cellules endothéliales et des cellules disposant d'une activité contractile, les péricytes, qui entourent les cellules endothéliales. Le premier lieu de sélectivité de passage des molécules est formé par les jonctions serrées existant entre les cellules endothéliales. De plus, ces cellules reposent sur une lame basale épaissie limitant ainsi la diffusion passive de grosses molécules. Les péricytes forment une couche discontinue autour du vaisseau et participent à l'élaboration de la matrice extracellulaire. Ils possèdent des propriétés contractiles et exercent un

contrôle local sur le flux sanguin (Chakravarthy and Gardiner, 1999). De par leurs diverses fonctions, les péricytes participent à l'homéostasie de la barrière hémato-rétinienne interne. La paroi des capillaires rétiens est également en contact avec des cellules gliales telles que les astrocytes et les cellules de Müller. Cette gaine gliale joue un rôle de support structural et trophique des cellules vasculaires contribuant ainsi à l'intégrité de l'étanchéité et de la vasomotricité des vaisseaux.

La barrière hémato-rétinienne externe est constituée par les cellules endothéliales des vaisseaux choroïdiens, la membrane de Bruch et l'EPR. Comme pour la barrière hémato-rétinienne interne, les cellules endothéliales sont unies par des jonctions serrées constituant, là aussi, un premier lieu de sélection des molécules. Néanmoins, les fenestrations qui existent entre les cellules endothéliales augmentent la perméabilité de la barrière hémato-rétinienne externe par rapport à la barrière hémato-rétinienne interne. La membrane de Bruch, fortement chargée négativement en raison de la présence de glycosaminoglycanes et des protéoglycanes, permet une seconde sélection des molécules pouvant atteindre la rétine. Enfin, les cellules de l'épithélium pigmentaire sont liées entre elles par des jonctions serrées qui leur confèrent un haut degré de contrôle de perméabilité des fluides et des solutés entre la circulation sanguine et la rétine neurale (Cunha-Vaz, 1997). La barrière hémato-rétinienne comporte de manière générale des cellules endothéliales mais aussi des péricytes et des cellules gliales formant l'unité neurovasculaire (Abbott et al., 2006). La présence de ces types cellulaires apparaît cruciale pour maintenir l'intégrité de cette barrière. Deux voies peuvent être affectées lorsque l'on considère la perméabilité de la barrière hémato-rétinienne (impliquée dans de nombreuses pathologies oculaires et notamment la RD) ; tout d'abord la voie de transport paracellulaire impliquant les jonctions serrées des cellules endothéliales, mais aussi la voie transcellulaire endothéliale médiée par des vésicules endocytotiques (cavéole) (Klaassen et al., 2009).

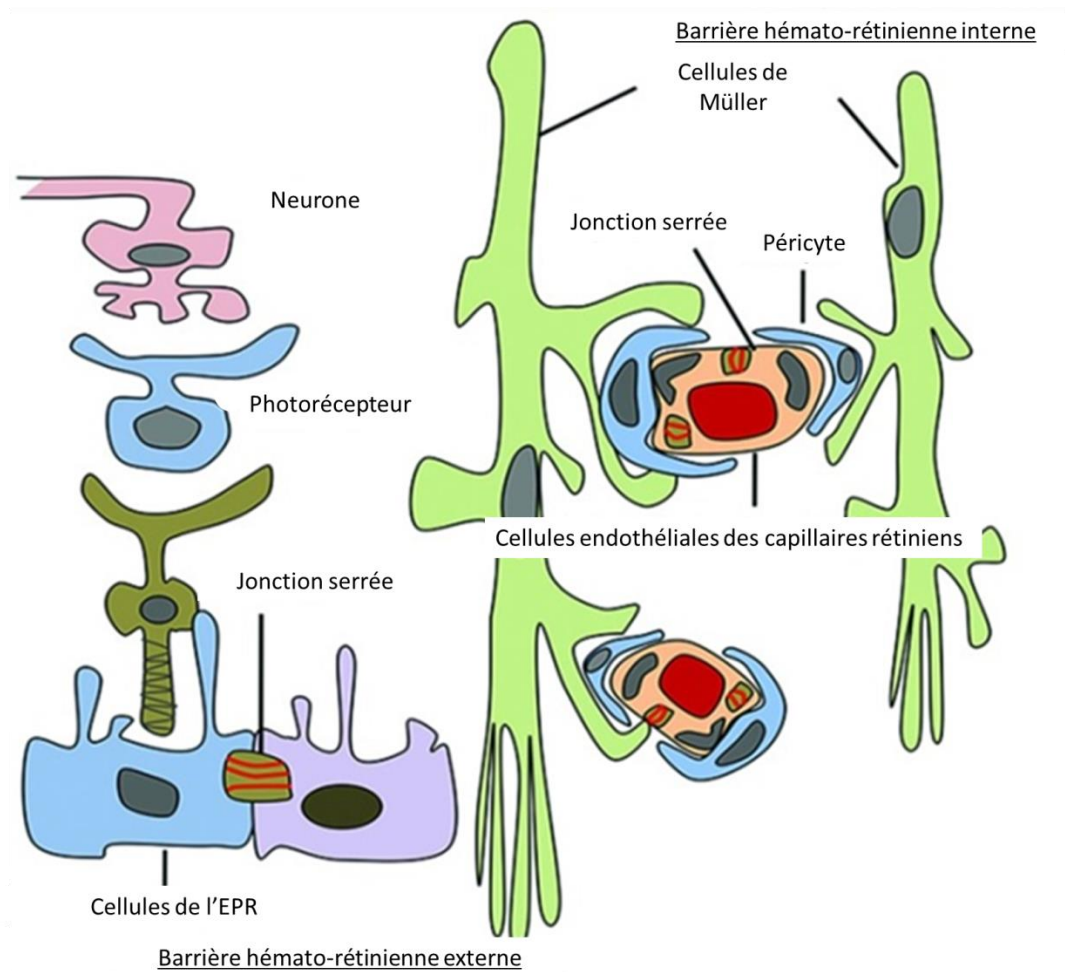


Figure 9 : Représentation des barrières hémato-rétiniennes interne et externe

Adapté de Che (Che et al., 2014).

II- Le syndrome métabolique

Le syndrome métabolique (SMet) est considéré aujourd'hui comme une véritable épidémie mondiale, avec des conséquences dramatiques sur la santé humaine. Il émerge principalement des changements drastiques dans notre alimentation concomitants à la réduction importante de l'activité physique et conduisant donc au déséquilibre de la balance apports/dépenses énergétiques.

Le SMet a fait sa première apparition sous le nom de Syndrome X (Reaven, 1988). Il fut décrit initialement par son auteur comme un ensemble de symptômes tels que la résistance à l'insuline, l'intolérance au glucose, l'hyperinsulinémie, l'augmentation du taux de triacylglycérols (TG), de lipoprotéines de basse densité (VLDL), la diminution de cholestérol HDL et l'hypertension. Reaven considérait l'insulinorésistance comme d'importance primordiale dans les pathologies coronariennes, l'hypertension et le diabète de type 2. L'insulinorésistance est un état métabolique dans lequel les tissus cibles, et plus globalement l'organisme, sont en incapacité de produire une réponse biologique adaptée aux modifications des taux de glucose sanguin ; il s'agit de la perturbation majeure du syndrome métabolique. De nombreuses définitions du syndrome métabolique ont été proposées par diverses organisations nationales et internationales mais toutes s'accordent sur ces composantes essentielles ; à savoir, obésité abdominale, insulinorésistance, intolérance au glucose, dyslipidémie et hypertension. Il s'agit d'un véritable état chronique d'inflammation à bas niveau résultant de l'association de facteurs à la fois environnementaux et génétiques (Kaur, 2014).

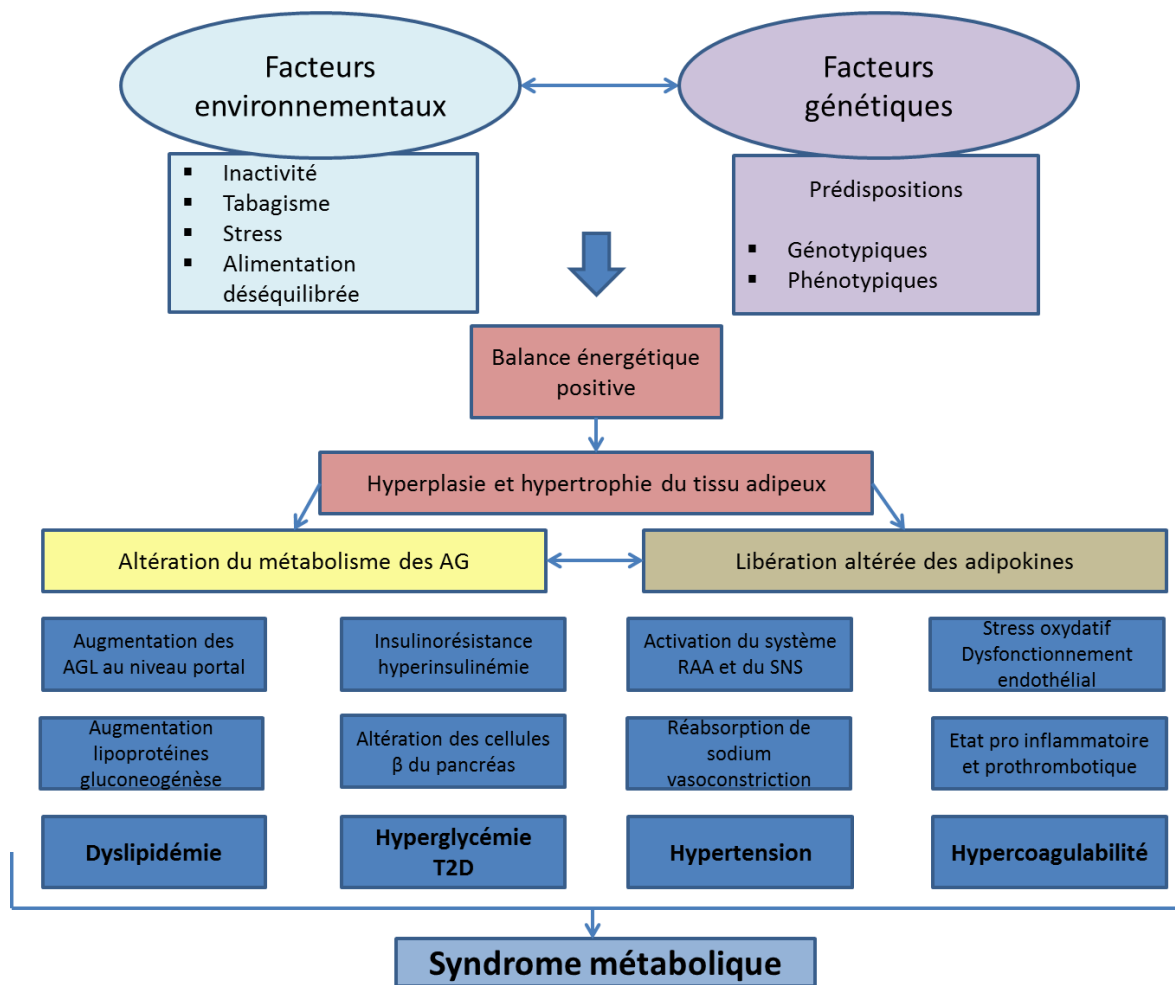


Figure 10 : Représentation schématique du Syndrome métabolique

AG : Acides gras ; AGL : Acides gras libres ; RAA : Rénine, Angiotensine, Aldostérone ; SNS : Système nerveux sympathique ; T2D : Diabète de type 2

Adapté de Kaur, 2014.

II.1 Fructose et Syndrome métabolique

II.1.1 La digestion des glucides

Il existe de nombreux monosaccharides dans la nature mais seul un nombre réduit intervient comme métabolite intermédiaire ou comme composant structural chez les mammifères. Le glucose est le sucre le plus consommé par les êtres humains. Deux autres hexoses, le galactose et le fructose sont également consommés de manière non négligeable, par exemple dans les pays occidentaux 15 à 20% des calories contenues dans le régime sont apportées par le fructose, représentant donc une contribution importante au métabolisme énergétique. Les glucides arrivent dans notre alimentation sous forme polymérisée (glycogène, amidon) ou libre (saccharose, lactose, fructose, glucose).

Le processus digestif commence dans la bouche, sous l'action de l' α -amylase salivaire (ptyaline). Cette dernière agit sur les amidons et le glycogène contenant des liaisons $\alpha(1-4)$ et $\alpha(1-6)$ délivrant ainsi un mélange d'oligosaccharides ramifiés, de maltose et de glucose. L'hydrolyse par cette enzyme se poursuit jusque dans l'estomac où sa forte acidité va stopper l'action de l' α -amylase salivaire. La digestion reprend dans la partie supérieure du jéjunum sous l'action de l' α -amylase pancréatique après neutralisation de l'acidité stomacale par les sécrétions pancréatiques (*Figure 11a*). L'hydrolyse complète est assurée par des enzymes constituées d'oligosidases et de glycosidases. Elles sont sécrétées par les cellules muqueuses intestinales auxquelles elles demeurent fixées dans la lumière de l'intestin. La sécrétine augmente les sécrétions biliaires et la libération de HCO_3^- . La cholecystokinine stimule les enzymes pancréatiques et inhibe les sécrétions gastriques (intervenant plutôt lors de la digestion des lipides et des protéines partiellement hydrolysées). Enfin, le peptide inhibiteur gastrique (GIP) inhibe l'activité gastrique et entraîne la libération d'insuline à partir des îlots pancréatiques. Le processus d'hydrolyse ralentit au fur et à mesure de la progression du bol alimentaire vers l'intestin grêle. La digestion complète conduit à un mélange de monosaccharides absorbés dans l'intestin au niveau du duodénum et du jéjunum. Différents mécanismes interviennent (*Figure 11b*) ; l'absorption du glucose et du galactose au niveau des cellules de la muqueuse intestinale peut se faire par processus de co-transport SGT (Serum glucose transporter), nécessitant de l'ATP et entraînant

l'absorption simultanée de Na^+ . La libération des oses dans le flux sanguin se fait par transport facilité en utilisant GLUT (Glucose transporter) ou par simple diffusion.

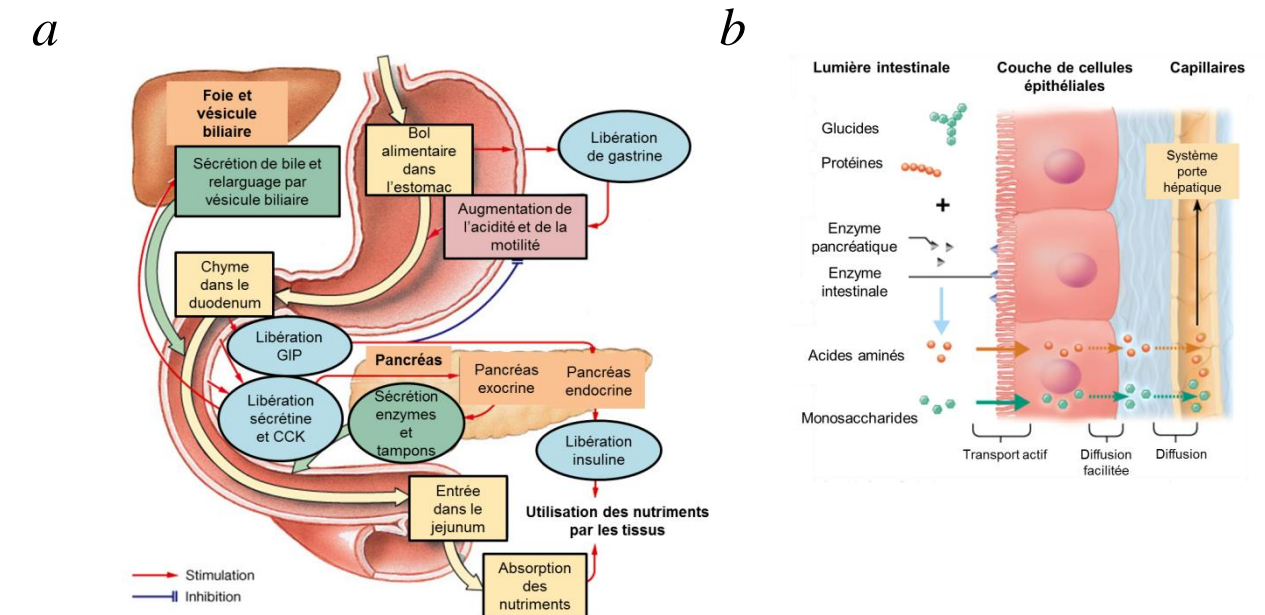


Figure 11 : Processus de digestion et d'absorption des nutriments

a : processus de digestion

GIP : Peptide d'inhibition gastrique, CCK : Cholécistokinine

b : absorption des nutriments issus du tractus intestinal

Adapté de Cummings B., 2001.

II.1.2 Le métabolisme du fructose

A l'inverse du glucose qui utilise le transporteur Glut 4, le fructose entre dans la circulation sanguine en utilisant les transporteurs Glut 2 et Glut 5. Ce transport ne fait pas appel à l'insuline (Glut 5 est un transporteur présent au niveau intestinal mais peu présent au niveau des cellules pancréatiques). Le fructose est alors délivré au niveau du foie via la veine porte (Mayes, 1993). Il est tout d'abord phosphorylé dans le foie par l'ATP pour former le fructose-1-phosphate, cette

réaction est catalysée par la fructokinase. Le fructose-1-phosphate est alors scindé par l'aldolase B en glyceraldéhyde et dihydroxyacétone phosphate. Ainsi la molécule initiale de fructose est métabolisée en 2 trioses-phosphates qui sont détournés de la principale voie de contrôle de la glycolyse par la 6-phosphofructokinase. Ces trioses constituent la structure essentielle à la synthèse de phospholipides et de triacylglycérols (Bray et al., 2004) (*Figure 12*). Les produits issus du métabolisme du fructose par la voie glycolytique dans le foie sont le glucose, le glycogène, le lactate et le pyruvate. L'absorption du fructose par le foie n'est pas limitée par les taux de phosphofructokinase, la consommation de fructose résulte ainsi en une augmentation des taux de lactate circulant bien supérieure à ceux produits par une consommation comparable de glucose.

Alors que la consommation de faibles doses de fructose semble montrer de véritables bénéfices pour la santé en régulant la production de glucose hépatique (Hawkins et al., 2002) ou en améliorant encore le contrôle glycémique de patients atteints de diabète de type 2 (Moore et al., 2001), l'ingestion de fortes quantités de fructose seraient plus problématique. En particulier, si celui-ci est apporté sous forme de sucrose ou de high fructose corn syrup (par l'intermédiaire de sodas, entre autres), une augmentation du métabolisme du fructose serait alors susceptible de contribuer à une surproduction hépatique de TAG et à une stéatose hépatique (Basaranoglu et al., 2013). Des études menées chez l'homme ont montré que l'ingestion de fructose résultait en une augmentation marquée de la lipogénèse de novo (Nomura and Yamanouchi, 2012) (Tappy and Lê, 2012), tandis que cette lipogénèse de novo n'augmentait pas en réponse à une ingestion de glucose à valeur calorique similaire (Hellerstein et al., 1996). Le fructose serait donc plus lipogénique que le glucose, effet qui apparaît de plus exacerbé si les sujets disposent de surcroît d'une hyperlipidémie, d'une insulino-résistance ou encore d'un diabète de type 2 (Jeppesen et al., 1995) (Abraha et al., 1998). Le fructose, de plus, ne stimule pas la production de deux hormones, l'insuline et la leptine. Ces hormones jouent cependant un rôle clé en tant que signal afférent dans le contrôle de la prise alimentaire et du poids corporel. Ainsi la diminution des réponses insulinémiques suite aux repas et leptinémiques associées à une consommation chronique de fructose seraient donc susceptibles d'avoir des effets délétères à long terme sur la régulation du métabolisme énergétique et de l'adiposité corporelle. Elles pourraient enfin jouer un rôle dans l'épidémie actuelle d'obésité (Bray et al., 2004).

L'insuline et la leptine sont deux hormones aux rôles clés. Elles sont impliquées dans la régulation de la prise alimentaire et la dépense énergétique et apparaissent déterminantes lorsque l'on s'intéresse à la consommation de fructose. En effet, le fructose à l'inverse du glucose, ne stimule pas la sécrétion d'insuline à partir des cellules β du pancréas (Grant et al., 1980) (Curry, 1989). Cette absence de stimulation est principalement due aux faibles concentrations du transporteur de fructose GLUT5 dans ces cellules β (Sato et al., 1996).

L'insuline est impliquée dans la régulation de l'adiposité corporelle via son action au niveau du SNC de manière à inhiber la prise alimentaire et à augmenter la dépense énergétique (Woods et al., 1996) (Schwartz et al., 2000). En effet, les récepteurs à l'insuline sont localisés dans des aires du SNC qui sont impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique. Ainsi, la répression de l'expression des gènes codants pour les récepteurs à l'insuline dans les neurones conduit à une hyperphagie et à l'obésité chez la souris (Brüning et al., 2000). De même, une libération d'insuline réduite dans le SNC ou un dysfonctionnement de la voie de signalisation de l'insuline pourrait résulter en une prise de poids et mener à l'installation de l'obésité (Fukami et al., 2013).

Une découverte capitale dans la recherche sur l'obésité est survenue lors de la découverte du gène déficient *ob* par les expériences de Coleman. Ces expériences mirent notamment en évidence des symptômes similaires à ceux d'un diabète chez des souris déficientes en récepteurs pour ce gène *ob* (Coleman and Hummel, 1969). Vingt-cinq ans plus tard ce gène a été cloné. Sa protéine, la leptine, a été synthétisée et clairement identifiée comme responsable de l'hyperphagie et de l'obésité au sein d'une souche de souris diabétiques obèses (Zhang et al., 1994). Ce gène est exprimé au sein du tissu adipeux (Masuzaki et al., 1995). La leptine fonctionne en tant que signal dans le SNC où elle active les voies anorexigènes de la Pro-opiomélanocortine (POMC) et inhibe les voies orexigènes du Neuropeptide Y et du Agouty related peptide (NPY/AGRP). Son action inhibe la prise alimentaire et augmente la dépense énergétique (Caro et al., 1996). Ainsi, des sujets humains identifiés comme présentant une hyperphagie et une obésité marquée disposent le plus souvent d'une incapacité à produire la leptine ou présentent des déficiences au niveau de leurs récepteurs (Montague et al., 1997) (Clément et al., 1998). Son effet sur la satiété a été également mis en évidence : l'administration de leptine permettrait en l'occurrence de réduire l'appétit chez des sujets humains (Westerterp-Plantenga et al., 2001). Les concentrations

plasmatiques de leptine sont de plus clairement corrélées avec le niveau d'adiposité que ce soit chez le rongeur (Ahrén et al., 1997) (Maffei et al., 1995), le primate ou encore l'être humain (Maffei et al., 1995) (Havel et al., 1996). Elle est en effet considérée comme un signal clé afférent lié au niveau d'adiposité et au statut nutritionnel (Shapiro et al., 2008). Un taux élevé de leptine pouvant être quelquefois associé à une leptinorésistance (Scarpace and Zhang, 2007).

Par ailleurs, les effets de l'insuline et de la leptine sur la prise alimentaire partagent une voie de signalisation commune via l'activation de la phosphatidyl-3-kinase au niveau hypothalamique. Malgré leur interaction ces deux hormones agissent de manières différées dans le temps. L'insuline exerce ses fonctions principalement à court terme, ses concentrations au niveau du SNC ayant un effet inhibiteur direct sur la prise alimentaire (Schwartz et al., 2000). La leptine quant à elle exerce ses fonctions à moyen et long terme en tant que facteur régulateur de la balance énergétique. Son action au niveau des neurones hypothalamiques et la présence de récepteurs au niveau du gastrus intestinal indiquent alors l'état de satiété (Havel, 2001). L'insuline est susceptible de modifier la prise alimentaire en stimulant l'expression du gène codant pour la leptine, induisant par la suite sa sécrétion. Ce mécanisme est principalement régulé par l'insuline sur le métabolisme du glucose au niveau adipocytaire. Il contribuerait à réguler la sécrétion de leptine de manière insulino-dépendante (Mueller et al., 1998). En plus de ses effets sur la prise alimentaire et la thermogénèse, la leptine serait également un médiateur de la réponse neuroendocrine face à une privation alimentaire. Une étude menée chez la souris a notamment montré des variations circadiennes de leptine plasmatique, avec des concentrations plus élevées la nuit, ainsi que la présence d'un pic de leptine à 16h en cas de jeûne (Ahima et al., 1998). Par ailleurs, la ghréline, une hormone peptidique produite au niveau du gastrus intestinal agit également au niveau de l'hypothalamus en stimulant l'activité des neurones à NPY dans le noyau arqué et en minimisant leur activité au niveau du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus. C'est à ce niveau que la ghréline conduirait à la libération de peptides orexigènes et de neurotransmetteurs diminuant ainsi l'action anorexigène de la leptine (Cowley et al., 2003). Les taux circulants de ghréline diminuent clairement 1 à 3 h après l'ingestion de boissons à base de glucose. Dans le cas d'une consommation de fructose, ces taux circulants de ghréline ne diminuent pas (Teff et al., 2004). Ainsi dans le cadre d'une consommation chronique de fructose, en période post prandiale, de faibles taux circulants d'insuline et de leptine seraient associés à

une augmentation circulante de ghréline. Ces perturbations au niveau hypothalamique pourraient donc mener à un dérèglement de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique.

II.1.4 Consommation de fructose et insulino-résistance

Les régimes riches en fructose sont connus pour induire une insulino-résistance chez le rongeur (Zavaroni et al., 1980) et chez le chien (Martinez et al., 1994). A ce titre, des expériences menées sur des rats nourris avec 35% de fructose pendant 4 semaines ont montré une diminution de sensibilité à l'insuline associée à une action déficiente de l'insuline au niveau hépatique et une tolérance au glucose réduite (Thorburn et al., 1989). Bien que le fructose ne stimule pas de sécrétion d'insuline à court terme (Curry, 1989), l'insulino-résistance induite par de longues périodes de régime fructose induit une hyperinsulinémie compensatoire (Reaven, 1988). A ce jour, l'effet de régimes enrichis en fructose reste peu documenté chez l'être humain et aucune donnée avérée ne permet de l'associer à l'induction d'une insulino-résistance. Cependant une étude comparant la consommation pendant 7 jours d'un régime riche en glucose et d'un autre riche en fructose a montré l'existence d'une diminution de sensibilité à l'insuline suite au régime fructose (Beck-Nielsen et al., 1980). Une relation classique est établie entre insulino-résistance, augmentation des taux circulants d'insuline plasmatique et intolérance au glucose. Il a été suggéré que ces changements métaboliques étaient médiés par l'augmentation des concentrations plasmatiques en acides gras libres (McGarry, 1994). En effet, une concentration élevée d'acides gras non estérifiés est l'une des conséquences métaboliques majeures d'une balance énergétique positive et d'une adiposité élevée (Jéquier and Tappy, 1999). La consommation de fructose engendrerait une sécrétion d'insuline réduite et une diminution de la production de leptine associées à une augmentation du taux circulant d'acides gras non estérifiés, ce qui serait susceptible de contribuer à l'augmentation du poids corporel. En effet, une exposition chronique à des taux élevés d'AG non estérifiés réduirait la sensibilité à l'insuline en augmentant le contenu lipidique intramyocellulaire. L'augmentation de la libération d'AG non estérifiés au niveau de la veine porte, en particulier en provenance du tissu adipeux viscéral, pourrait entraver le métabolisme des glucides, en favorisant la production de glucose hépatique associé à des effets délétères sur la fonction des cellules β (Bergman and Ader, 2000). Cette libération d'AG non estérifiés conduirait également à une augmentation des triacylglycérols et des VLDL (Arner,

2001). L'hypertriglycéridémie induite par un régime enrichi en fructose serait peut-être donc l'un des mécanismes potentiels concourant à l'induction d'une insulino-résistance.

II.2 Le diabète de type 2 et la rétinopathie diabétique (RD)

II.2.1 Epidémiologie et physiopathologie du diabète de type 2

Le SMet comme nous l'avons vu précédemment se définit comme un ensemble de facteurs physiologiques, métaboliques, biochimiques et cliniques interconnectés qui conduisent à multiplier par 2 le risque de développer des pathologies cardiovasculaires et par 5 le risque de développer un diabète de type 2 (Kaur, 2014).

Le diabète est une maladie métabolique qui, sans traitement approprié, est caractérisée par une hyperglycémie chronique résultant de l'incapacité du corps à produire l'insuline et/ou à être résistante à son action (Deshpande et al., 2008). Cette pathologie est caractérisée par un désordre du métabolisme des glucides, lipides et protéines. Elle est associée au développement de complications microvasculaires spécifiques telles que les rétinopathies et néphropathies diabétiques et de complications macrovasculaires aspécifiques, en augmentant notamment le risque de développer des maladies cardiovasculaires (Aalto, 1999).

Le terme de diabète recouvre deux maladies différentes :

- le diabète insulino-dépendant (type 1), qui survient le plus souvent avant l'âge de 20 ans et représente 10 à 15 % des diabètes,
- le diabète non insulino-dépendant (type 2), qui survient le plus souvent après l'âge de 50 ans et représente 85 à 90 % des diabètes.

En particulier, le diabète de type 2 est reconnu comme un véritable problème de santé publique aussi bien en France, où l'on dénombre environ 3,5 % de diabétiques (soit 1 600 000 diabétiques connus et 400 000 diabétiques qui s'ignorent), mais aussi en Europe où le nombre de diabétiques est évalué à 30 millions, et aux Etats-Unis où il existerait 15 millions de diabétiques pour moitié méconnus. Dans le monde entier, on dénombre 285 millions de diabétiques et ce nombre devrait atteindre 438 millions d'ici 2030 (www.afd.asso.fr). La prévalence du diabète de type 2 augmente parallèlement au vieillissement, à l'urbanisation, à la sédentarisation et au développement de

l'obésité. Elle est de plus sous-estimée car cette anomalie glycémique asymptomatique peut évoluer de façon insidieuse et silencieuse pendant de nombreuses années avant que son diagnostic ne soit établi.

Dans 80% des cas, le diabète de type 2 est associé à une obésité. Il est le plus souvent polygénique résultant de l'association d'une prédisposition génétique et de facteurs environnementaux. L'OMS définit le diabète de type 2 « comme dû à un déficit variable de l'insulino-sécrétion associé à un déficit variable de la sensibilité à l'insuline ». Le poids du mot variable prend ici toute sa signification justifiant de la complexité de cette pathologie qui ne dispose pas d'un mécanisme physiopathologique univoque.

Le diabète de type 2 dépend de l'expression de plusieurs gènes de susceptibilité (ou de prédisposition), sous l'influence de facteurs environnementaux tels qu'un terrain familial favorable, un surpoids et/ou un comportement sédentaire. L'anomalie métabolique fondamentale qui précède le diabète de type 2 est l'insulinorésistance qui entraîne en réponse un hyperinsulinisme. Par la suite, il apparaît une insulinodéficience responsable de l'hyperglycémie. L'insulinorésistance est secondaire à l'excès de graisse au niveau du muscle et à l'augmentation du tissu adipeux viscéral. Elle se traduit par une diminution de la sensibilité à l'insuline qui s'exerce au niveau périphérique, mais également au niveau hépatique.

L'insulinorésistance périphérique est omniprésente lors d'un diabète de type 2. L'action de l'insuline sur les tissus périphériques, en particulier au niveau du muscle, fait suite à la liaison de l'insuline à un récepteur spécifique (IR) hétérotétramérique. Ce récepteur est composé de deux sous-unités α extracellulaires qui lient l'insuline d'une part et de deux sous-unités β qui possèdent une activité tyrosine kinase (TK) intracellulaire d'autre part. La liaison de l'insuline à son récepteur entraîne l'autophosphorylation de la sous-unité β du récepteur sur un certain nombre de tyrosines. Cette autophosphorylation stimule l'activité TK du récepteur envers des substrats cellulaires, dont le rôle est de transmettre le signal hormonal à l'intérieur de la cellule, conduisant ainsi à la réponse biologique.

La résistance à l'insuline combine alors deux types d'anomalies spécifiques. D'une part, une anomalie de la liaison de l'insuline à son récepteur (IR) qui correspond à une diminution du nombre de récepteurs sans modification de leur affinité. D'autre part, une anomalie de la

transmission post-récepteur, caractérisée par un défaut de l'activité du transport transmembranaire du glucose en réponse à la liaison insuline/IR. L'insulinorésistance périphérique induit donc un déficit de captation du glucose par les tissus insulino-dépendants et tient donc un rôle important dans le développement de l'hyperglycémie post-prandiale. L'insulinorésistance hépatique quant à elle, est susceptible de mener à la libération d'une grande quantité d'acides gras libres. Le flux portal d'acides gras libres favorise alors la synthèse hépatique de triglycérides et stimule par suite la néoglucogenèse hépatique. La production hépatique de glucose joue alors un rôle primordial dans l'élévation de la glycémie à jeun.

Le stockage et l'utilisation du glucose sont ainsi diminués au niveau musculaire alors qu'au niveau hépatique il y a une stimulation de la néoglucogenèse. Ceci concourt donc à l'élévation de la glycémie.

II.2.2 Les modèles animaux de diabète

De nombreux modèles animaux sont couramment utilisés en recherche sur le diabète. La majorité des études s'appuient sur le modèle rongeur, les plus connus sont répertoriés dans le *Tableau 1*. Au cours des dernières années, l'évolution croissante des techniques de biologie moléculaire ont permis de produire une grande gamme de nouveaux animaux spécifiques pour l'étude du diabète, incluant ainsi des animaux ayant subi des « knock-in » (invalidation d'un ou plusieurs gènes cibles, remplacé par un ou plusieurs gènes d'intérêt), des « knock-out » généralisés (inactivation d'un ou plusieurs gènes remplacés par un ou plusieurs variants altérés et non fonctionnels) ou encore des « knock-out » tissus spécifiques.

Tableau 1 : Modèles animaux de diabètes

Adapté de Rees et Alcolado (Rees and Alcolado, 2005).

Modèles animaux de diabète	Méthode, paramètres
Modèles d'hyperglycémie	
Pancréatectomie (rats, souris)	Chirurgicale, ablation partielle ou totale du pancréas
Streptozotocine, Alloxan, Vacor, Dithizone8-hydroxyquinalone	Non chirurgicale, induction pharmacologique
Modèles de diabète de type 1 spontané	
Souris diabétique non obèse (NOD) Rat Bio Breeding (BB) Rat Long Evans Tokushima (LETL) Lapin blanc de Nouvelle Zélande Chien Keeshond Hamster chinois Macaque noir	
Modèles de diabète de type 2	
Souris Ob/Ob	Modèle monogénique d'obésité déficient en leptine
Souris db/db	Modèle monogénique d'obésité, déficient en récepteur à la leptine,résistant à la leptine
Rat Zucker (fa/fa)	Modèle monogénique d'obésité résistant à la leptine
Rat du Nil (Arvicanthis Niloticus)	Modèle de SMet (hyperinsulinémie, adiposité abdominale, augmentation du taux de TG et de cholestérol, hypertension) développé dans les premiers mois de vie.
Rat de Sables (Psammomys obesus)	Modèle de diabète lorsqu'il est élevé en captivité
Souris KK japonaise	Modèle de diabète consécutif à une alimentation hypercalorique.
Souris NSY Souris CBA/Ca Souris obèse de Nouvelle Zélande Rat OLETF Rat traité à la streptozotocine + régime « high-fat » Rat Torri diabétique	

II.2.3 La rétinopathie diabétique

II.2.3.1 Epidémiologie

Considérant l'épidémie globale de diabète à travers le monde, l'incidence de la rétinopathie diabétique (RD), une complication microvasculaire due au diabète, affecterait 93 millions de personnes à travers le monde (Yau et al., 2012). La rétinopathie diabétique est une des 5 premières causes majeures de déficience visuelle. Dans les pays industrialisés, la rétinopathie diabétique est la première cause de cécité chez les moins de 50 ans. On estime que 100% de la population des diabétiques de type I sera atteinte de rétinopathie diabétique au bout de 10 ans d'évolution de leur diabète, et qu'elle affectera 33% des patients atteints de diabète de type II après 20 ans d'évolution. Parmi ceux-ci, un tiers aura une rétinopathie potentiellement cécitante. Enfin, un tiers des diabétiques ayant des complications cécitantes deviendra définitivement aveugle (OMS). Dans l'étude sur la cohorte Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy (WESDR). La rétinopathie proliférative est la complication la plus prévalente observée 23% (< 30 ans), 10% (\geq 30 ans) (Klein et al., 1992b). Toujours dans le cadre de la WESDR, une récente étude a révélé que la baisse de l'acuité visuelle et le statut de la rétinopathie diabétique n'avait cependant pas de réel impact sur les scores d'évaluation de la qualité de vie en termes de santé mentale et physique des patients atteints de diabète de type I (Hirai et al., 2013).

II.2.3.2 Sémiologie

La RD peut être classée en rétinopathie diabétique non proliférante (RDNP) ou proliférante (RDP). La RDNP est subdivisée en différents stades en fonction du niveau d'avancement de la pathologie (minime, modéré ou sévère), impliquant ou non le développement d'œdème maculaire.

L'aspect sémiologique de la RD est complexe, impliquant l'apparition de nombreuses anomalies illustrées dans la *Figure 13*. Le premier signe ophtalmoscopique de la RD est l'apparition de microanévrismes qui se développent à partir du réseau rétinien superficiel ou profond au niveau de la portion veineuse du capillaire. Ils se présentent sous la forme de lésions punctiformes rouges de type microanévrismes de diamètre généralement compris entre 10 et 125 μ m dont le nombre augmente progressivement au cours de l'évolution de la pathologie.

Un passage anormal de constituants plasmatiques au travers de la paroi altérée des vaisseaux rétiens peut se produire, on parle alors de diffusion ou rupture de la barrière hémato-rétinienne interne. Elle est la cause de la formation d'œdèmes et d'exsudats qui peuvent s'observer très précocement et disparaître spontanément. Lorsque ce liquide extracellulaire s'accumule dans la région maculaire cela s'accompagne d'une dégradation visuelle lente et progressive. Si cet œdème est important il peut s'accompagner d'un décollement séreux rétinien, si ce dernier est étendu la vision est alors effondrée. Les exsudats sont des dépôts jaunes, intrarétiniens, parfois sous rétiens qui prennent une disposition en couronne autour des anomalies microvasculaires dont ils sont issus.

L'ischémie rétinienne survient très tôt au cours de l'évolution de la RD au niveau du pôle postérieur. L'occlusion capillaire survient dans les stades précoces entraînant des micro-zones d'ischémie rétinienne, les microanévrismes étant probablement déjà une réponse néovasculaire à l'ischémie locale, ces zones d'ischémie s'étendant alors progressivement. Une ischémie prolongée engendre une néovascularisation pré-rétinienne précédée par l'apparition d'anomalies microvasculaires intra-rétiniennes. Enfin, le décollement de la rétine est une complication sévère de la RDP.

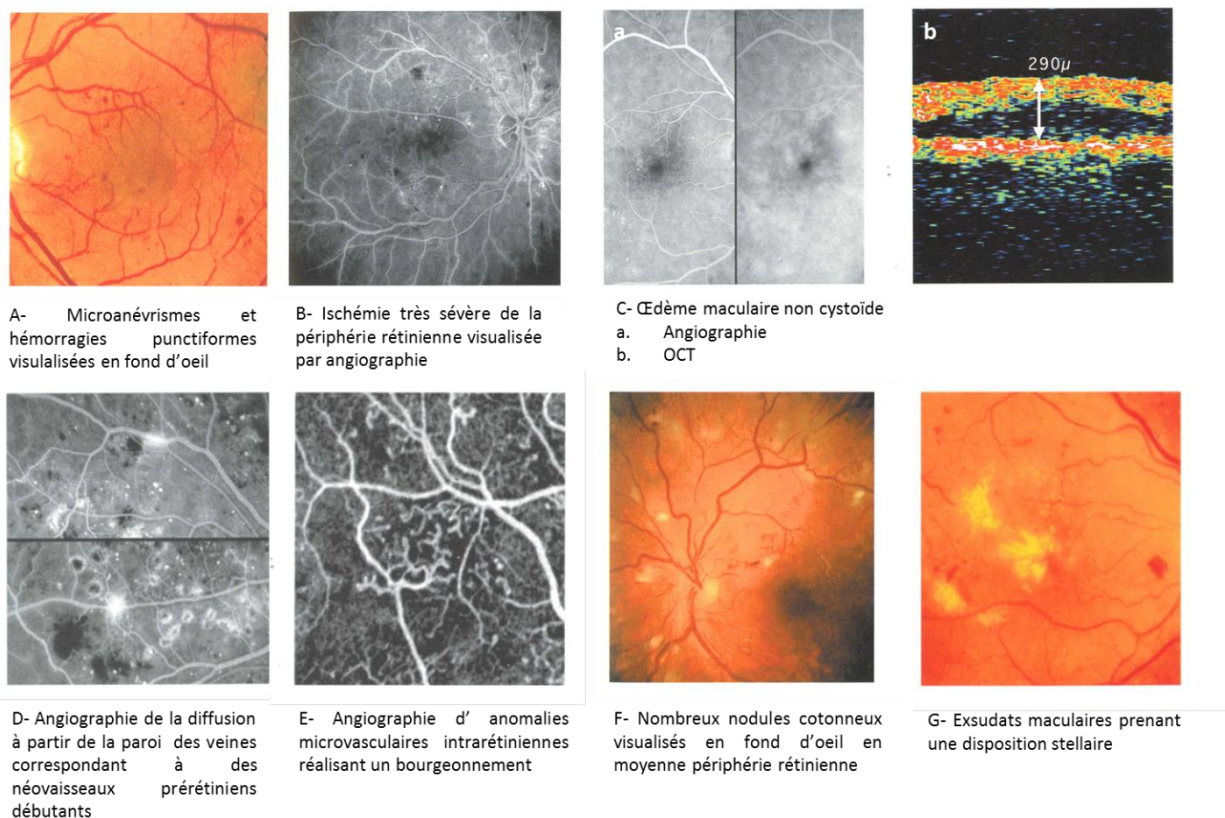


Figure 13 : Illustration sémiologique de la RD

Adapté de l'EMC d'ophtalmologie © Elsevier Masson SAS

II.2.3.3 Physiopathogénie

La rétinopathie diabétique est une pathologie multifactorielle, l'hyperglycémie reste à ce jour le facteur le plus documenté et est tenu comme responsable de la RD. Ses conséquences pour la rétine sont drastiques et complexes. Les mécanismes d'altérations cellulaires dus à l'imprégnation du glucose sont notamment la perte des péricytes et la modification de la perméabilité des vaisseaux ; œdème maculaire et néovascularisation étant l'aboutissement de divers phénomènes intriqués.

De nombreuses recherches à travers le monde se focalisent sur la compréhension des mécanismes pathogéniques sous-jacents dans le but de prévenir l'apparition de la RD. Différents processus biochimiques ont alors été proposés en tant que composantes clés du développement de la rétinopathie diabétique ; tels que l'augmentation de la voie des polyols, l'activation de la protéine

kinase C (PKC), la formation des produits de glycation avancés, l'inflammation et le stress oxydatif. Ces différentes composantes participeraient activement à l'augmentation de l'expression de facteurs de croissance (Tarr et al., 2013a).

➤ *La voie des polyols*

Dans le cadre d'un diabète, la voie des polyols métabolise l'excès de glucose, l'enzyme aldose réductase présente dans la rétine réduit le glucose en sorbitol en utilisant NADPH comme cofacteur. Les membranes cellulaires étant imperméables au sorbitol, il est alors converti en fructose par la sorbitol déshydrogénase (SDH) qui s'accumule alors au sein de la cellule (Gabbay, 1975) (Kinoshita, 1990). Le cofacteur NADPH est aussi requis par la glutathione réductase en tant que cofacteur régénérant le glutathion dans les cellules, réduisant ainsi la capacité antioxydante des cellules. L'accumulation de sorbitol est à même d'engendrer divers effets délétères dans la rétine incluant des perturbations osmotiques (Gabbay, 1973). De plus, le fructose produit par la voie des polyols peut être phosphorylé en fructose-3-phosphate qui est ensuite dégradé en 3-désoxyglucosone, les deux étant de forts potentiels agents de glycation menant à la production de produits terminaux de glycation (AGE) (Szwergold et al., 1990). L'utilisation de NADPH en tant que cofacteur dans la voie des polyols résulte en une moins bonne disponibilité de NADPH pour l'utilisation de la glutathione réductase, cruciale pour la synthèse du glutathion réduit. Cette diminution de glutathion réduit disponible résulte en une diminution de la protection contre le stress oxydatif (Barnett et al., 1986) et pourrait ainsi mener à une production augmentée d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule (Lassègue and Clempus, 2003).

➤ *La glycation non enzymatique des protéines*

Parmi les différents mécanismes pathogéniques qui contribuent à la rétinopathie diabétique, la formation des produits de glycation avancés détient une place de choix. Dans un état physiologique normal, la formation d'AGE à un faible taux est un mécanisme constant au cours du temps. Dans le cadre du diabète, une disponibilité accrue de glucose induit de nombreuses altérations cellulaires parfois irréversibles. Parmi ces altérations la formation d'AGE via les réactions de Maillard est largement favorisée (Vlassara and Palace, 2002) (Peppia and Vlassara, 2005). Les AGE sont un groupe de molécules hétérogènes formées par une réaction non enzymatique suite à une dégradation de sucres associés à des groupements amines de protéines,

de lipides ou encore d'acides nucléiques. Le produit initial de cette réaction est appelé base de Schiff, cette base se réorganise alors spontanément en produit d'Amadori (*Figure 14*). Une caractéristique clé de ces précurseurs des AGE est leur capacité à former des liaisons covalentes avec les protéines, altérant ainsi leurs fonctions. Les AGE peuvent aussi interagir avec des récepteurs à la surface des cellules tels que les récepteurs aux produits de glycation avancés (RAGE) menant à une activation cellulaire et à un effet pro-oxydant ainsi qu'à des événements pro-inflammatoires. Des études menées chez l'animal ont montré qu'une forte exposition aux AGE contribuait à entraîner des complications de type vasculaire (Hammes et al., 1996) (Stitt et al., 2002). En particulier une étude menée par Hammes a montré qu'après l'induction d'un diabète chez le rat, les capillaires rétiniens présentaient une augmentation accrue d'AGE et une perte des péricytes (Hammes et al., 1991).

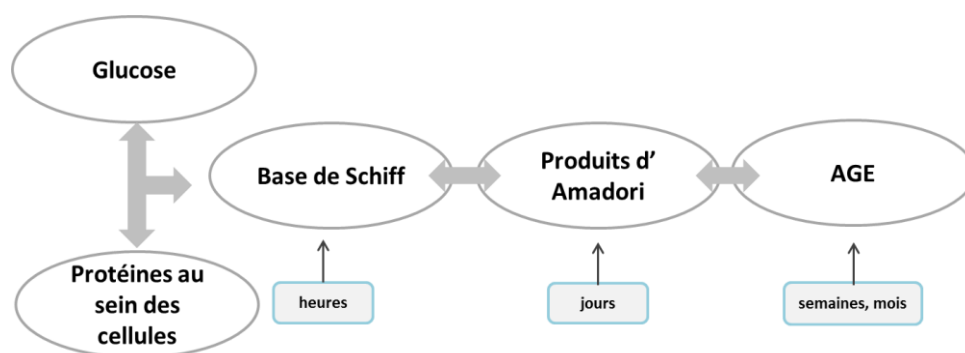


Figure 14 : Formation des produits de glycation avancés (AGE)

Adapté de Tarr (Tarr et al., 2013b).

➤ *L'activation de la protéine kinase C*

La PKC est une famille de 10 enzymes, au sein de laquelle les isoformes $\beta 1$ et $\beta 2$ apparaissent étroitement liées au développement de la RD (Koya and King, 1998).

La PKC est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la transduction de signal au niveau hormonal, neuronal et en réponse à certains facteurs de croissance. Une hyperglycémie mènerait à une augmentation du flux de glucose au travers de la voie de la glycolyse qui conduirait à une

synthèse de novo de diacylglycérol (DAG), un activateur clé de plusieurs isoformes de PKC. Des études cliniques et expérimentales ont notamment démontré une augmentation de l'expression de DAG associée à une activation de PKC sous état diabétique (Koya and King, 1998). L'activation de la PKC générerait un effet cascade sur d'autres voies biochimiques influençant ainsi des changements au niveau de la perméabilité endothéliale, au niveau hémodynamique dans la rétine mais aussi sur l'expression de VEGF dans les tissus rétiens (Aiello et al., 1997) (Aiello et al., 2006).

➤ *L'activation de la microglie*

L'activation gliale induite suite à une hyperglycémie est suspectée de contribuer au développement précoce de la RD et est associée à des altérations électrorétinographiques, bien avant que des signes de microangiopathies soient cliniquement détectables (Kern, 2007).

Des études ont notamment mis en évidence des changements morphologiques dans la microglie détectés avant tout signe d'apoptose neuronale ou d'activation d'autres cellules gliales dans la rétine après induction d'un diabète chez des souris par alloxan (Gaucher et al., 2007). La densité des cellules microgliales dans la rétine serait également augmentée significativement chez des rats soumis à des injections de streptozotocine (Zeng et al., 2000). Dans des stades précoces de diabète chez le rat une augmentation de l'expression d'Iba1 a été également mise en évidence et coïnciderait avec l'activation microgliale (Chen et al., 2014). L'activation précoce de la microglie dans la rétine chez l'animal laisse suggérer qu'elle pourrait jouer un rôle important dans la pathogénèse de la rétinopathie diabétique (Chen et al., 2014).

➤ *Le stress oxydatif*

Le stress oxydatif peut se définir comme un état de déséquilibre entre le taux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les défenses anti-oxydantes dans un système biologique (Baynes, 1991). Le stress oxydatif induit par l'hyperglycémie est une voie importante des complications microvasculaires diabétiques (Cui et al., 2006). En conditions physiologiques normales, les ROS sont détoxifiées grâce à divers agents réducteurs et séquestrants tels que la thioredoxine, le glutathion, le tocophérol ou encore des enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD). L'augmentation du stress oxydatif dans un cadre pathologique résulterait d'une part en une surproduction de précurseurs de radicaux oxygénés et d'autre part en une inhibition des systèmes

de protection (Baynes, 1991). Des études récentes ont montré l'implication des ROS médiés par l'activation de la métalloprotéinase 2 (MMP-2) dans le développement de la DR. L'activation de MMP-2 pourrait être à l'origine de la mort cellulaire des cellules endothéliales en raison d'un dysfonctionnement mitochondrial qui activerait la cascade apoptotique (Mohammad and Kowluru, 2011).

➤ *Les facteurs de croissance*

De nombreux facteurs de croissance ont été associés au développement de la RD, incluant Vascular endothelial growth factor (VEGF), Fibroblast growth factor b (bFGF), Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), Angiopoietin 1 et 2, Stromal derived factor-1, Epidermal growth factor (EGF), Transforming growth factor β 2 (TGF β 2), Platelet-derived growth factor (PDGFs) et Erythropoietin (Tarr et al., 2013a).

Des taux élevés d'IGF-1 ont été retrouvés dans le vitré et le sérum de patients diabétiques mais son rôle précis dans la pathologie de la RD reste inconnu (Romaniuk et al., 2013). Le facteur de croissance le plus étudié dans le cadre de la RD est le facteur VEGF qui existe sous 4 espèces moléculaires homodimériques. Le VEGF est un facteur connu pour promouvoir l'angiogénèse, causer des ruptures de la barrière hématorétinienne, stimuler la croissance des cellules endothéliales mais aussi la néovascularisation et enfin augmenter la perméabilité vasculaire dans une rétine ischémique (Comer and Ciulla, 2004) (Zhang et al., 2009).

➤ *Les défenses anti-oxydantes*

Dans le cadre de la RD l'utilisation d'anti-oxydants appropriés peuvent avoir des effets potentiels sur les conséquences métaboliques et fonctionnelles de cette pathologie. Les anti-oxydants peuvent agir à différents niveaux soit en inhibant la formation de ROS ou de radicaux libres soit en augmentant les capacités anti-oxydantes des enzymes.

L'acide lipoïque permettrait de lutter contre les ROS et de réduire les métabolites tel que le glutathion afin de maintenir un état redox cellulaire stable (Packer et al., 1995). Il atténuerait également l'apoptose des cellules des capillaires rétiens chez le rat (Kowluru and Odenbach, 2004). En tant que cofacteur critique des complexes enzymatiques mitochondriaux, il permettrait de lutter également contre la diminution d'activité mitochondriale observée en cas de diabète induit chez l'animal (Obrosova et al., 2003).

La Benfotiamine, un dérivé liposoluble de la thiamine (vitamine B1) permettrait d'inhiber l'augmentation de capillaires acellulaires dans la rétine de rats diabétiques en bloquant notamment la voie des PKC et des hexosamines (Hammes et al., 2003).

Le Trolox, un analogue hydrosoluble de la vitamine E, empêcherait la perte des péricytes chez les rats diabétiques en réduisant la peroxydation lipidique des membranes (Ansari et al., 1998).

La Nicanartine, un antioxydant aux propriétés hypocholestérolémiantes pourrait également partiellement inhiber la perte de péricytes chez le rat diabétique (Hammes et al., 1997)

Le Zinc préviendrait de la diminution de glutathion dans la rétine dans le cadre d'un diabète (Moustafa, 2004), il permettrait également de protéger la rétine des atteintes des ROS induisant apoptose des péricytes, rupture des capillaires et néovascularisation (Miao et al., 2013). Le Sélénium, un autre oligoélément, serait susceptible de diminuer la production de VEGF dans la rétine en cas de diabète (McCarty, 2005).

Des études utilisant une supplémentation de complexes d'antioxydants comprenant notamment Vitamine C et Vitamine E ont montré que ces vitamines pourraient empêcher l'inhibition de la glutathione réductase, de la glutathione peroxydase et des activités superoxydes dismutases (SOD) (Kowluru et al., 1997). Ce complexe permettrait également d'éviter le développement de capillaires acellulaires chez des rats diabétiques (Kowluru, 2001). Des bénéfices sur la survie des cellules rétinienne ont également été montrés chez le rat diabétique par l'utilisation d'un ensemble d'antioxydants incluant Acide ascorbique, α -tocophérol acetate, Trolox, N-acetyl cystéine, β carotène et Sélénium. Ces mêmes composants abrogeraient l'augmentation de PKC et de NO dans la rétine induits par le diabète. Ils réduiraient aussi la peroxydation lipidique et préviendraient de la diminution de SOD et de glutathione réductase (Kowluru et al., 1999).

Une récente étude a mis en évidence que la vitamine A (26 à 52 mg) était susceptible d'améliorer les conséquences de dégénérescence rétinienne faisant suite à une obésité chez le rat. Elle engendrerait la surexpression de gènes tels que rhodopsine, arrestin, phosphodiesterase, transducine et fatty acid elongase-4. D'autre part, l'expression de GFAP (glial fibrillary acidic protein) serait également diminuée (Tiruvalluru et al., 2013).

Malgré les bénéfices intéressants des antioxydants obtenus sur le modèle animal, les résultats obtenus lors d'études cliniques sont plus ambigus. Le Calcium dobesilate, un composé avec une activité antioxydante potentielle est d'ores et déjà utilisé pour le traitement de la RD, montrant une diminution de la progression des complications liées au diabète (Garay et al., 2005). Le Picnogénol, un composé aux propriétés anti-inflammatoires permettant de lutter contre les radicaux libres a montré également des effets bénéfiques sur la progression de la RD chez des patients diabétiques (Spadea and Balestrazzi, 2001). A l'inverse, aucune association n'a été mise en évidence entre la majorité des antioxydants alimentaires dans le sérum et la RD chez des patients atteints de diabète de type 2. Enfin, une étude a rapporté des effets bénéfiques sur la RD d'une supplémentation incluant vitamines C, E et β -carotène (Mayer-Davis et al., 1998).

II.2.3.4 Les modèles animaux de rétinopathie diabétique

Il n'existe pas à ce jour de modèle animal parfait de RD combinant tous les aspects sémiologiques de cette pathologie chez l'homme. Le *Tableau 2* répertorie les modèles rongeurs les plus couramment utilisés en laboratoire pour simuler les conditions de la RD.

Tableau 2 : Modèles rongeurs de RD

CG : Cellules ganglionnaires, MB : membrane de Bruch, BHR : barrière hémato-rétinienne

Adapté de Robinson (Robinson et al., 2012)

Modèle animal	Type de diabète	Age de début du diabète	Lésions rétinienne
Rat			
STZ	Type 1	3j après injection	Perte des péricytes, rupture des vaisseaux, perte des CG, endommagement des cellules endothéliales, occlusion des vaisseaux et des capillaires rétinien, affinement de la MB
Galactosémie	-	-	Perte des péricytes, capillaires acellulaires, affinement de la MB
BB	Type 1	2-5 mois	Perte des péricytes, capillaires acellulaires, rupture de la BHR, affinement de la MB
WBN /Kob	Type 1	9-21 mois	Capillaires acellulaires, affinement de la MB
SDT	Type 1	5-6 mois	Perte des péricytes, capillaires acellulaires, rupture des vaisseaux, détachement rétinien, prolifération fibreuse
ZDF	Type 2	1-2 mois	Perte des péricytes, capillaires acellulaires, affinement de la MB
OETF	Type 2	4-5 mois	Microanévrismes, tortuosité, boucles capillaires, irrégularités dans le calibre des vaisseaux, affinement de la MB
Souris			
STZ	Type 1	3 jours après injection	Perte des péricytes, capillaires acellulaires, apoptose des cellules vasculaires, perte des CG, affinement de la rétine
Galactosémie	-	-	Perte des péricytes, capillaires acellulaires, microanévrismes, affinement de la MB
NOD	Type 1	8 mois	Perte des micro-vaisseaux rétinien, prolifération de nouveaux vaisseaux anarchiques
db/db	Type 2	1-2 mois	Perte des péricytes, capillaires acellulaires, rupture de la BHR, amincissement de la MB
Ins2 ^{Akita}	Type 1	1 mois	Augmentation de la perméabilité vasculaire, capillaires acellulaires, amincissement de la rétine, perte des CG
Akimba	Type 1	1 mois	Microanévrismes, rupture des vaisseaux, dilatation des vaisseaux, tortuosité, hémorragies, possible néovascularisation, œdème rétinien

II.3 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)

La DMLA est la première cause de cécité dans les pays développés avant 50 ans et la 3ème cause de cécité au monde (Pascolini and Mariotti, 2012). Sa forme précoce est appelée maculopathie liée à l'âge (MLA) et ses deux formes avancées sont la DMLA exsudative et la DMLA atrophique.

La MLA est caractérisée par un affinement de l'EPR et de la membrane de Bruch, elle inclut la formation de drusen (amas lipidiques et protéiques jaunâtres) et mène progressivement à une atrophie de l'EPR et des photorécepteurs, son évolution est lente. La DMLA atrophique est définie par une atrophie rétinienne à bord nette permettant la visualisation des vaisseaux choroïdiens. Enfin la forme humide ou exsudative est caractérisée par la prolifération anormale de vaisseaux sous la macula menant à une réorganisation de la rétine centrale et à une cicatrisation fibreuse, son évolution est rapide. Parmi les formes de DMLA, la prévalence de la DMLA exsudative est de 55% contre 45% pour la DMLA atrophique (Friedman et al., 2004).

(Figure 15)

Différentes écoles s'affrontent quant à la classification des MLA et DMLA. Selon l'étude AREDS, différents stades ont été définis

-Stade 1 : moins de 5 drusen ($<63\mu\text{m}$)

-Stade 2 : nombreux petits drusen ou drusen intermédiaires ($63-124\mu\text{m}$) peu nombreux, ou altérations de l'EPR

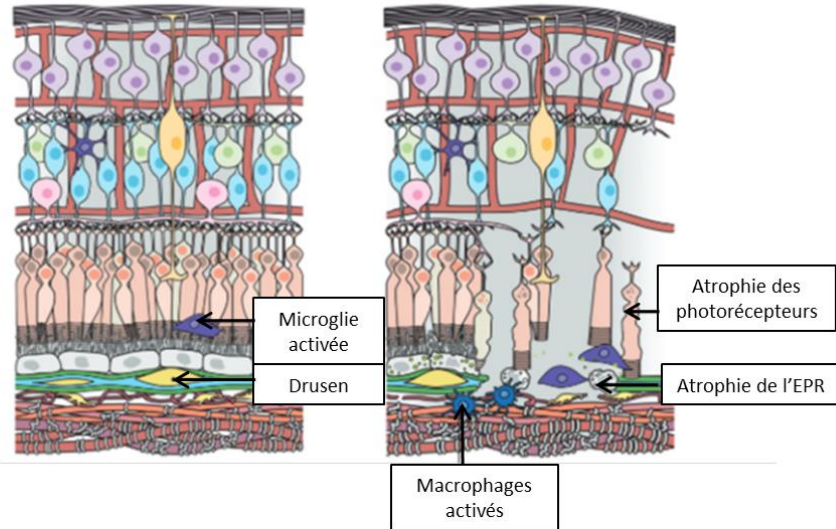
-Stade 3 : au moins un gros drusen ($>125\mu\text{m}$) ou nombreux drusen intermédiaires ou atrophie géographique non centrale

-Stade 4 : DMLA évoluée à 1 seul œil (atrophie géographique centrale ou néovascularisation choroïdienne)

Les stades 2 et 3 constituent la maculopathie liée à l'âge (MLA) qui peut être asymptomatique ou se traduire par un trouble de l'adaptation au changement d'ambiance lumineuse ou encore par un besoin accru d'éclairage lors de la lecture. Ces stades 2 et 3 prédisposent au développement d'un stade 4. Le stade 4 constitue la DMLA à proprement parler.

A - MLA

B - DMLA atrophique



C - DMLA néovasculaire avec un vaisseau occulte

D - DMLA néovasculaire avec un vaisseau visible

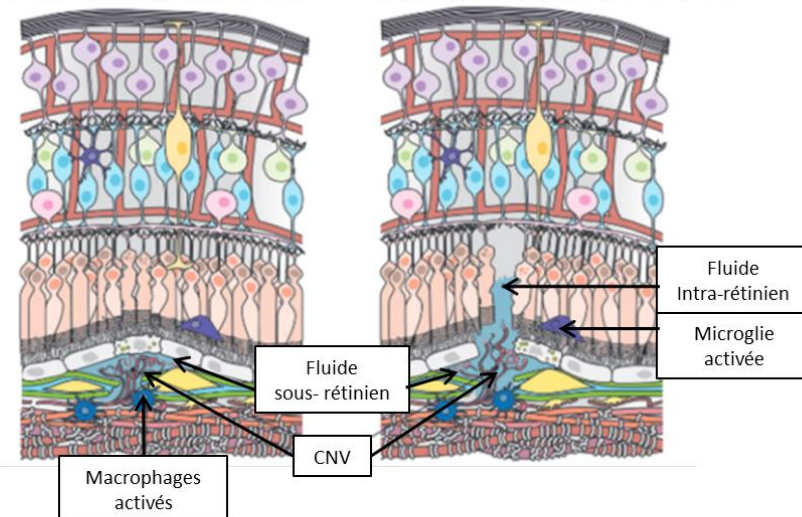


Figure 15 : Les différentes formes de MLA et DMLA

EPR : Epithélium pigmentaire rétinien, CNV : Néovascularisation choroïdienne

A : Rétine présentant une MLA. Accumulation de déchets protéiques et lipidiques appelés drusen altérant les fonctions de barrière de la membrane de Bruch. Inflammation dans la rétine externe signalée par la présence de cellules microgliales activées.

B : Rétine présentant une atrophie géographique. A ce stade avancé de la DMLA, la membrane de Bruch est sévèrement endommagée, la perte et l'atrophie des photorécepteurs et des cellules de l'EPR sont prononcées. La perte d'autres types cellulaires tels que les cellules horizontales, bipolaires et amacrines est également évidente. La choriocapillaire est faiblement perfusée, l'inflammation est importante signalée par la présence de microglie et de macrophages en abondance dans l'aire dégénérée.

C : Rétine présentant une DMLA néovasculaire avec un vaisseau occulte. La membrane de Bruch est endommagée par la présence de néovaisseaux immergeant de la choriocapillaire. Les fluides libérés à partir des néovaisseaux s'accumulent sous l'EPR dans l'espace sous-rétinien, engendrant une désorganisation des structures locales et causant un stress de l'EPR et des cellules photoréceptrices. La choriocapillaire est pauvrement perfusée et l'inflammation manifeste du fait de la présence de microglie activée et de macrophages.

D : Rétine présentant une DMLA néovasculaire avec un vaisseau visible. Présente les mêmes caractéristiques pathologiques que C, avec un phénotype additionnel ; les néovaisseaux entraînent une rupture de la couche de l'EPR progressant dans la couche de photorécepteurs, résultant en une accumulation de fluide dans l'espace intra-rétinien.

Adapté de van Lookeren Campagne (van Lookeren Campagne et al., 2014).

II.3.1 Epidémiologie

La DMLA est une pathologie fortement associée aux populations caucasiennes et asiatiques, sa prévalence serait selon l'étude Baltimore Eye study, 10 fois plus présente chez les caucasiens que chez les africains ou américains (Friedman et al., 1999). En termes de prévalence globale, elle affecte 8% des plus de 50 ans soit 1,5 millions de personnes en France, dont 600 000 MLA et 900 000 DMLA (www.sfo.asso.fr). Cette prévalence augmente avec l'âge touchant 1% des moins de 55 ans jusqu'à atteindre 25% des plus de 75 ans. L'Eureye study indique des fréquences de DMLA symptomatiques de 1% avant 70 ans et de 12% après 80 ans (Augood et al., 2006).

II.3.2 Facteurs de risques environnementaux et génétiques

L'étiologie de la DMLA est multifactorielle, facteurs environnementaux et génétiques contribuant à l'installation et au développement de la pathologie, mais l'âge avancé demeure le premier d'entre eux.

Parmi les facteurs environnementaux, le tabagisme est l'un des facteurs de risques les plus importants, confirmé à la fois à la suite d'études menées sur les effets de la nicotine sur la néovascularisation choroïdienne chez le modèle animal (Suñer et al., 2004) mais aussi dans des populations humaines (Seddon et al., 1996) (Delcourt et al., 1998). L'obésité et plus particulièrement l'indice de masse corporelle associé aux facteurs alimentaires affecterait également l'incidence de la DMLA (Ersoy et al., 2014). Un régime alimentaire possédant un index glycémique élevé serait également associé à un risque augmenté de développer une DMLA et favoriserait aussi sa progression (Chiu et al., 2007). De plus la consommation de graisses saturées et de cholestérol serait susceptible d'augmenter le risque de MLA (Mares-Perlman et al., 1995). Un régime sain et équilibré, le contrôle du poids, la pratique d'une activité physique et l'absence de tabagisme permettrait donc de réduire le risque de développer une DMLA (Cho et al., 2001a) (Seddon et al., 2001a) (Seddon et al., 2003). Certaines pathologies telles que les pathologies cardiovasculaires et les atteintes des fonctions rénales du fait du partage de facteurs de risques communs peuvent également être associées à la DMLA, (Klein et al., 2003) (Sobrin and Seddon, 2014). Par ailleurs, différentes études ont montré que le diabète pouvait également constituer un terrain favorable à l'installation de la maculopathie et de la DMLA (Mitchell and Wang, 1999) (Topouzis et al., 2009). D'autre part, le facteur VEGF, un

facteur clé dans le développement de la néovascularisation choroïdienne dans la DMLA serait également augmenté chez des patients atteints de syndrome métabolique (Jesmin et al., 2013).

Depuis 2005, de nombreux variants génétiques ont été associés avec la DMLA, ceux considérés comme courants sont répertoriés dans le *Tableau 3*.

Le polymorphisme de 2 gènes (CFH et LOC387715) en particulier, semble très fortement apparié à cette pathologie. Le polymorphisme de gènes codant pour le complément du facteur H (CFH), conférerait en effet un risque accru de développer une DMLA, de nombreuses protéines du système des compléments ayant été identifiées au sein des drusen. L'association du CFH avec les protéines reliées au CFH 1 et 3 dans le cadre de la DMLA a récemment été suggéré, la suppression de ces protéines conférant un caractère protecteur (Calippe et al., 2014). Cependant comprendre quels mécanismes d'altérations du CFH seraient susceptibles d'induire une inflammation et/ou phagocytose dans le cadre de la DMLA reste un enjeu majeur de la recherche dans ce domaine (Calippe et al., 2014). Des études menées sur des souris invalidées pour le CFH ont montré un effet âge-dépendant sur le déclin de leur acuité visuelle et ont mis en évidence le rôle du CFH dans sa capacité à neutraliser les effets pro-inflammatoires et à atténuer le stress oxydatif. Des articles récents ont montré une association entre un polymorphisme commun de gènes du CFH (T1277C ou Y402H), la présence de drusen et la probabilité de développer une DMLA avancée, incluant atrophie géographique et DMLA néovasculaire (Haines et al., 2005) (Klein et al., 2005) (Edwards et al., 2005) (Postel et al., 2006).

Par ailleurs, un autre gène de susceptibilité, LOC387715 (variant rs10490924), a récemment été identifié, mais sa caractérisation biologique est encore peu claire (Rivera et al., 2005). Une étude a notamment mis en évidence que des fumeurs présentant le variant LOC387715 avaient une plus grande probabilité de développer une DMLA avancée et en particulier de type néovasculaire (Schmidt et al., 2006).

Tableau 3 : Variants des gènes associés à la pathologie de la DMLA

Adapté de Sobrin et Seddon (Sobrin and Seddon, 2014).

Gènes et variants	Voies concernées et/ou fonctions suspectées dans la pathologie de la DMLA
CFH (Y402H, RS1410996) FACTOR B CC 2 ET 3 CF 1 ET 2	Système du complément, réponse immunitaire et inflammatoire
LOC387715 (RS10490924)	Possiblement associé au tabagisme, voie encore non déterminée
HTRA1 VEGFA TGFB1	Angiogenèse, signalisation de TGF- β
LIPC, CETP, ABCA1, APOE	Voie de HDL-C
TIMP3 COL10A1/FRK , COL8A1	Matrice extracellulaire
TNFRSF10A, IER/DDR1, SLC16A8, RAD51B, ADAMTS9/MIR548A2, B2GALTL	Stress oxydatif, réparation de l'ADN

II.3.3 Physiopathogénie de la DMLA

II.3.3.1 Des formes précoces aux formes atrophiques

➤ *La formation de drusen*

La pathogénèse de la MLA est caractérisée par un amincissement de la membrane de Bruch et à l'accumulation de lipides et de protéines qui forment des amas appelés drusen sous l'EPR. La mise en place de ces amas lipido-protéiques interfère avec les échanges au travers de l'EPR et de la membrane de Bruch, induisant un stress de l'EPR. En effet, les cellules stressées sont connues pour libérer des exosomes susceptibles d'être impliqués dans les dépôts de la région sub-EPR. Ceci conduit à une augmentation du gradient de lipofuscine au sein des cellules de l'EPR, affectant les fonctions lysosomales et le métabolisme du cholestérol (Miller, 2013). Les dépôts sub-EPR sont classés selon deux types : les dépôts basaux laminaires (BlamD) et les dépôts basaux linéaires (BlinD). Les BlamD sont des dépôts constitués de matériel membranaire et de collagène situés entre la membrane plasmique et la base laminaire de l'EPR. Les BlinD sont des matériaux vésiculaires logés dans les couches de collagène internes de la membrane de Bruch. Le rôle des drusen dans la pathogénèse de la DMLA est encore mal connu bien qu'il soit reconnu qu'ils constituent les lésions caractéristiques de cette pathologie.

➤ *Le stress oxydatif*

La génération et la neutralisation des radicaux libres est un processus physiologique. Bien que ces radicaux soient scrutés par les systèmes de défenses antioxydantes leur présence n'est pas toujours délétère. C'est plutôt le déséquilibre entre oxydants et antioxydants en faveur des oxydants qui résultera alors en un stress oxydatif. Le concept a été initialement formulé par Harman en 1956 qui proposait que le vieillissement proviendrait en fait de atteintes induites par des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Harman, 1956). Des données expérimentales soutiennent ces propos indiquant que le stress oxydatif jouerait un rôle certain dans les processus de vieillissement et dans la pathogénèse de nombreuses maladies liées au vieillissement telle que la DMLA (Chiba et al., 2009).

En effet, la rétine est un tissu abondant en ROS. Tout d'abord, la consommation d'oxygène dans la rétine est la plus élevée comparée aux autres tissus humains (Yu and Cringle, 2001). D'autre

part, l'EPR et les photorécepteurs sont exposés à une haute quantité d'énergie lumineuse, particulièrement centrée au niveau de la macula (Youssef et al., 2011). De même, les membranes cellulaires des photorécepteurs sont très riches en AGPI-LC qui sont susceptibles d'être facilement oxydés du fait de la présence de nombreuses doubles liaisons, par nature très sensibles aux oxydations (Anderson et al., 1974). Différentes molécules telles que les rétinoïdes et bis-rétinoïdes sont présentes dans l'EPR et dans les photorécepteurs. Ils représentent des photosensibilisants possibles dans le cadre d'altérations photochimiques (Hunter et al., 2012). Enfin la phagocytose des segments externes des photorécepteurs conduite par les cellules de l'EPR s'accompagne d'un métabolisme oxydatif important et donc une propagation rapide de ROS (Miceli et al., 1994). En effet, les segments externes des photorécepteurs contiennent des lipides, des protéines et des particules facilement oxydables en particulier dans un environnement riche en oxygène associé à une exposition lumineuse (Tate et al., 1997). Une étude a notamment mis en évidence le potentiel rôle du carboxyethylpyrrole, un produit d'oxydation du DHA au sein de la rétine externe, susceptible d'induire des lésions similaires à celles retrouvées dans la DMLA chez la souris (Hollyfield et al., 2008).

➤ *L'autophagie*

L'autophagie est une voie lysosomale essentielle dégradant les protéines cytoplasmiques et les organelles endommagées (Eskelinen, 2008). Ce processus est particulièrement important dans des cellules telles que celles de l'EPR qui sont soumises à une activité de phagocytose accrue due au renouvellement journalier des segments externes des photorécepteurs. Il existe 2 voies autophagiques, la première la micro autophagie, est médiée par des protéines chaperonnes. La seconde la macro autophagie, représente la voie principale permettant le transport des organelles et des agrégats de protéines jusqu'au lysosome (Klionsky et al., 2007). Les autophagosomes formés fusionnent avec le lysosome où leur contenu est dégradé grâce à des enzymes lysosomales (Kaarniranta et al., 2013). Lors du vieillissement des cellules de l'EPR, l'autophagie conduit à l'accumulation de lipofuscine lysosomale, contribuant largement à la pathogénèse de la DMLA (Sparrow and Boulton, 2005). La lipofuscine et l'un de ses fluorophores, A2E (un bis-rétinoïde pyridinium) peut générer une augmentation de pH et diminuer son potentiel de dégradation, réduisant ainsi la capacité fonctionnelle de l'EPR tout en augmentant le stress cellulaire (Bergmann et al., 2004).

➤ *Microglie et macrophages*

Bien que la DMLA ne soit pas une pathologie inflammatoire classique, une augmentation du nombre de macrophages a été détectée dans les aires endommagées de la membrane de Bruch et de l'EPR (Buschini et al., 2011) (Grossniklaus et al., 2002). L'infiltration de macrophages et de cellules microgliales dans l'espace sous rétinien est également précisé dans le cadre d'un stress induit par la lumière (Kohn et al., 2014). Il existe deux types de macrophages, les macrophages M1 pro inflammatoires et les macrophages M2 anti inflammatoires, leurs fonctions principales étant d'éliminer les déchets et de participer au renouvellement tissulaire. Les macrophages M2 ont des effets bénéfiques à long terme intervenant dans la dégradation des drusen dans les stades initiaux de la pathologie. Les macrophages M1 quant à eux, incitent une réponse inflammatoire suite aux atteintes rétinienne présentes (Mettu et al., 2012).

La présence prolongée des macrophages et des cellules microgliales dans un cadre pathologique tel que la DMLA est largement associé avec une dégénérescence des photorécepteurs (Combadière et al., 2007a). Des données mettent également en évidence une association de ces cellules avec le développement de néovascularisation choroïdienne chez le modèle animal. En effet, ces cellules sont d'importantes sources de cytokines et de facteurs pro-angiogéniques tel que le VEGF (Yi et al., 1997). Les chimiokines influent directement sur les leukocytes. Ainsi la signalisation de CCL2 au travers de CCR2, et la signalisation de CX3CL1 au travers de CX3CR1 semblent être des facteurs clés dans le recrutement de macrophages au niveau de lésions tissulaires (Combadière et al., 2008) (Combadière et al., 2003). CX3CR1 en particulier, serait impliqué dans le contrôle de la migration microgliale (Combadière et al., 2007a).

L'accumulation de macrophages et de la microglie dans l'espace sous rétinien lors de la DMLA amène à suggérer qu'un dysfonctionnement de la signalisation de CX3CL1/CX3CR1 jouerait un rôle potentiel dans la pathogénèse de la DMLA. Cependant les mécanismes menant à cette accumulation restent obscurs. Concernant la signalisation de CCL2/CCR2, il semblerait que son inhibition ait des effets bénéfiques sur la formation de CNV ainsi que sur la dégénérescence de photorécepteurs associée à la présence de cellules microgliales et macrophages. Cette voie de signalisation prendrait toute son importance dans les stades précoces de DMLA (d'après la revue de Raoul et al., 2010). Une étude récente a notamment mis en évidence qu'une délétion de CCL2 et de CCR2 (ou leur inhibition) pourrait amener à diminuer l'inflammation sous rétinienne et la

dégénérescence des photorécepteurs chez des souris invalidées pour le gène CX3CR1. En effet, CX3CR1 serait constitutivement exprimé dans la rétine où il réprimerait l'expression de CCL2 et le recrutement des monocytes CCR2 neurotoxiques et inflammatoires (Sennlaub et al., 2013).

II.3.3.2 Les formes néovasculaires

La DMLA néovasculaire ou humide est généralement diagnostiquée par la présence au niveau de la macula, d'un décollement de l'EPR et/ou de la rétine, de la présence d'exsudats, de cicatrices fibrovasculaires et parfois d'hémorragies. La néovascularisation choroïdienne est une réaction secondaire à d'autres altérations pathologiques survenues précédemment. Par exemple, un stress de l'EPR ou un endommagement associé aux réponses immunitaires de l'organisme sont connus pour promouvoir la production de facteurs pro-angiogéniques menant au mécanisme de CNV (Ambati and Fowler, 2012). Les lésions précoces dans la DMLA indiquent une perte des vaisseaux et/ou une réduction de la perfusion dans la choriocapillaire et au niveau de la couche de Sattler (au sein de la choroïde) qui précèdent la formation de vaisseaux pathologiques. La perte vasculaire est souvent accompagnée par l'accumulation de macrophages et corps cellulaires étrangers ainsi que par les premiers signes de l'angiogénèse tels que l'activation des cellules endothéliales et des péricytes (McLeod and Luty, 1994) (Killingsworth, 1995). Ces changements avasculaires asymptomatiques peuvent ainsi résulter en une hypoxie et en une sur-expression de facteurs pro-angiogéniques dans la choroïde, menant à la formation de vaisseaux pathologiques. Parmi les différents facteurs pro-angiogéniques, VEGF-A apparaît être un facteur clé aussi bien chez les modèles animaux que chez l'être humain (Kwak et al., 2000) (Bhutto et al., 2006) (Campa et al., 2008). VEGF-A serait responsable de multiples altérations endothéliales affectant l'intégrité structurelle des microvaisseaux rétinien, entraînant une extravasation des protéines plasmatiques vers le compartiment extracellulaire. Ainsi, les inhibiteurs de VEGF-A sous forme d'injections intravitréennes ont démontré leur efficacité en clinique dans le but de traiter la DMLA exsudative (Lally et al., 2012), permettant de réduire significativement les œdèmes et de faire régresser dans certains cas les vaisseaux pathologiques (Frampton, 2013).

II.3.4 Les modèles animaux de DMLA

Un modèle idéal de DMLA consisterait à exprimer l'ensemble des changements histologiques et fonctionnels propres à la pathologie ; il présenterait idéalement un faible coût ainsi qu'un temps

d'évolution rapide. De nombreux modèles animaux de DMLA ont été créés dans cet objectif, cependant la DMLA reste un processus complexe impliquant à la fois facteurs génétiques et environnementaux. La susceptibilité de cette pathologie ne tient pas à seulement à un seul gène mais bien à un ensemble de polymorphismes génétiques (*Tableau 3*). Cette pathologie est avant tout multi causale ; stress oxydatif, inflammation, métabolisme des glucides et des lipides étant impliqués dans la DMLA. Par ailleurs, les différences anatomiques entre les espèces animales utilisées en tant que modèle de DMLA et la rétine humaine sont nombreuses, à commencer par l'absence de macula chez le modèle rongeur. Cependant le rongeur offre de nombreux avantages en termes de coût, de progression de la pathologie sur une échelle de temps courte et de facilité d'obtention de modèles génétiques spécifiques.

Parmi les modèles rongeurs de DMLA les plus usités pour simuler une DMLA sèche nous retrouvons des modèles mettant en jeu le polymorphisme génétique de la voie du complément telles que la souris *cfh* *-/-* (Coffey et al., 2007), la souris transgénique *cfh* y402h (Ufret-Vincenty et al., 2010), la souris transgénique surexprimant *c3* (Cashman et al., 2011), la souris *c3a* et *c5a* (récepteur *-/-*) (Nozaki et al., 2006). D'autres modèles sont aussi focalisés sur la mutation vis-à-vis de l'expression de chemokines telles que la souris *ccl2* *-/-* et *ccr2* *-/-* (Ambati et al., 2003), la souris *cx3cr1* (Combadière et al., 2007b), la souris *ccl2/cx3cr1* *-/-* (Tuo et al., 2007). Il existe aussi des modèles d'altérations oxydatives tels que la souris knock-out pour *Sod1* (Imamura et al., 2006), la souris knock-down pour *sod2* (Justilien et al., 2007), l'association fumée de cigarette ou hydroquinone +/- régime high fat +/- lumière bleue (Espinosa-Heidmann et al., 2006), la souris *nrf2* *-/-* (Zhao et al., 2007), la rat OXYS (Markovets et al., 2011). Une modification du métabolisme glucidique/lipidique a permis également l'obtention de modèles notamment par l'utilisation d'un régime high fat chez la souris âgée (Cousins et al., 2002), par l'utilisation de régimes à index glycémique élevé (Uchiki et al., 2012). L'association d'un régime high fat avec des modèles de souris transgéniques ont été également développés. Ces différentes souches sont *apoe2/e4* (Malek et al., 2005), *apoe3* (Kliffen et al., 2000), *apob100* (Fujihara et al., 2009), récepteur *ldl* *-/-* (Rudolf et al., 2005)). L'utilisation des souris mutées *vldlr* *-/-* (Heckenlively et al., 2003), *cd36* *-/-* (Picard et al., 2010), *apoe* (Dithmar et al., 2000) est également décrite. Il existe par ailleurs des modèles de souris à senescence accélérées telles que les souris SAM (Takada et al., 1993).

Parmi les modèles de DMLA humide, le modèle le plus fréquemment utilisé lors d'expérimentation chez le rongeur est le modèle de photocoagulation laser (ou modèle CNV) (Lambert et al., 2013). Les impacts lasers réalisés permettent d'induire une rupture de la membrane de Bruch qui conduit à la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de la choroïde. Ces vaisseaux vont ensuite émerger au niveau de l'espace sous-rétinien mimant ainsi les principales caractéristiques des formes exsudatives de DMLA (Tobe et al., 1998). Dans ce modèle, les cellules inflammatoires sont supposées être les initiatrices potentielles du processus angiogénique au travers des mécanismes de relargage de facteurs pro-angiogéniques (Noël et al., 2007). Parmi ces facteurs, VEGF-A représente le facteur angiogénique principal impliqué dans la formation de CNV. D'autres facteurs apparaissent également importants dans ce processus tels que Placental Growth Factor (PlGF) (Rakic et al., 2003) et certaines protéases (Lambert et al., 2003) (Lambert et al., 2001). Plus récemment une relation a été établie entre le CFH, CCL2, VEGF et le complément MAC lors du développement de CNV. Le complément MAC est un médiateur agissant en amont qui influencerait sur le développement de CNV induit par laser. Au niveau de l'EPR et de la choroïde, CFH régulerait la formation locale du complément MAC. MAC aurait ainsi des effets directs sur le facteur VEGF, lui-même médié par CCL2 (Lyzogubov et al., 2010) (Liu et al., 2011).

III. Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne de type oméga 3

III.1 Structure et propriétés physico-chimiques des acides gras

Les acides gras sont des molécules organiques constitués d'une chaîne hydrocarbonée linéaire terminée à une extrémité par un groupement méthyle et à l'autre par un groupement carboxyle. Cette chaîne peut être dépourvue de double liaison, on parle alors d'acide gras saturé (AGS), elle peut posséder une double liaison, il s'agit alors d'acides gras monoinsaturés (AGMI), ou enfin posséder plusieurs doubles liaisons, ce sont les acides gras polyinsaturés (AGPI).

Les différentes familles d'AG insaturés sont référencées par rapport à la présence de la première double liaison du côté méthyle terminal. Ainsi, les acides gras des familles oméga 6 (ou n-6) et oméga 3 (ou n-3) ont pour caractéristique de posséder leur première double liaison respectivement à 6 carbones et 3 carbones de l'extrémité portant le groupement méthyle terminal. L'acide linoléique C18:2 n-6 et l'acide alpha-linolénique C18:3 n-3 sont respectivement les précurseurs des lignées oméga 6 et oméga 3 d'acides gras polyinsaturés (*Figure 16*) et doivent impérativement être apportés par l'alimentation. En effet, les animaux incluant l'espèce humaine n'ont pas la capacité pour une synthèse de novo de ces acides gras, du fait de l'absence des enzymes $\Delta 15$ et $\Delta 12$ désaturases qui seraient nécessaires à leur synthèse à partir de l'acide oléique (C18:1 n-9). On parle à ce titre d'acides gras essentiels. Par ailleurs, l'être humain et l'animal sont capables à partir de ces précurseurs et à l'aide d'enzymes spécifiques d'ajouter des doubles liaisons supplémentaires en direction de l'extrémité carboxyle et d'allonger la chaîne carbonée au niveau de cette extrémité. Certains de ces AG dont le nombre de carbones est supérieur ou égal à 18, sont appelés acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC). C'est le cas des acides arachidonique (C20:4 n-6), eicosapentaénoïque (C20:5 n-3) et docosahexaénoïque (C22:6 n-3). Ils sont considérés comme des acides gras indispensables, en raison de leurs multiples fonctions biochimiques et cellulaires.

Trois activités enzymatiques sont impliquées dans la formation des AGPI-LC : la désaturation en position $\Delta 6$, l'élongation et la désaturation en position $\Delta 5$ (*Figure 16*). Ces activités de désaturation consistent en l'addition de doubles liaisons et sont catalysées par des enzymes

appelées désaturases. Les élongases permettent l'allongement de la chaîne hydrocarbonée. Ces enzymes permettent notamment la conversion de l'acide alpha linolénique (ALA, C18:3 n-3) en acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 n-3), puis en acide docosapentaénoïque (DPA, C22:5 n-3) et enfin en acide docosahéxaénoïque (DHA, C22:6 n-3). Si l'acide linoléique et l'acide alpha linolénique utilisent les mêmes voies de conversion en AGPI-LC, les deux familles oméga 6 et oméga 3 ne sont cependant pas interchangeables, l'une entrant en compétition avec l'autre.

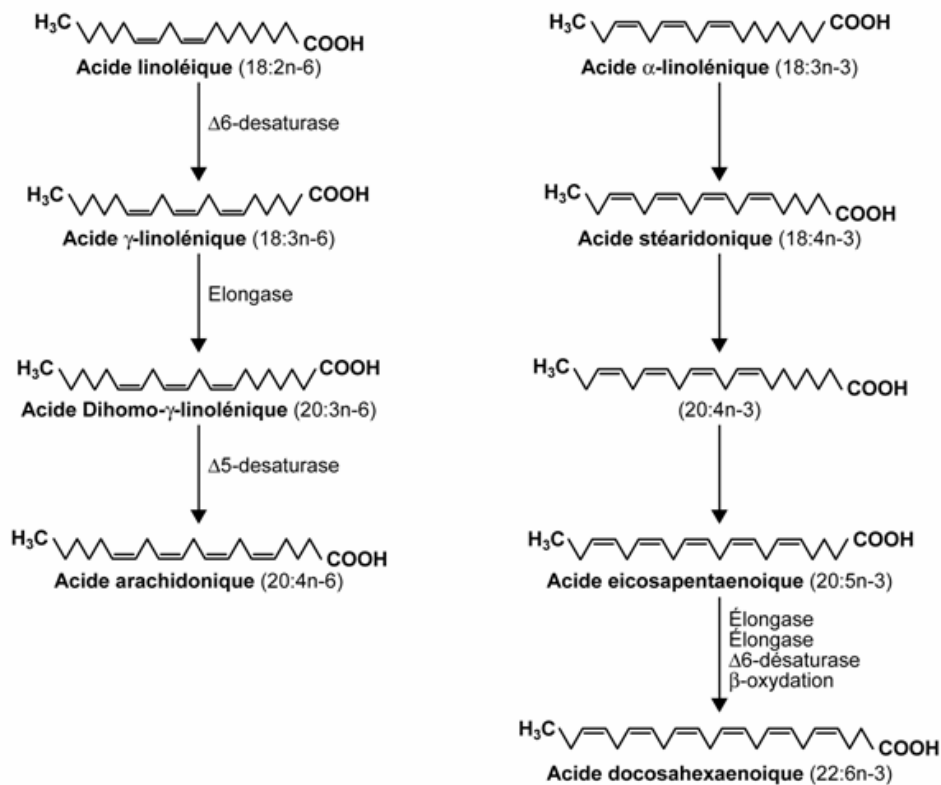


Figure 16 : Structure des acides gras oméga 6 et oméga 3

Les AGPI-LC sont présents dans l'organisme essentiellement sous forme estérifiée au sein des phospholipides (principalement en position sn-2 du glycérol) ou des triacylglycerols (TAG). Les phospholipides sont les éléments structuraux des membranes. Dans la rétine neurale, ils représentent en masse presque 90% des lipides. Les phospholipides y sont particulièrement riches en AGPI-LC, dont en AA et en DHA (Fliesler and Anderson, 1983) (Bretillon et al., 2008). La

phosphatidylcholine (PC) représente 40 à 50% des phospholipides de la rétine. Elle est principalement localisée dans les feuillettes externes des membranes. Elle est suivie par la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine qui représentent respectivement 30-35% et 5-10% des phospholipides de la rétine. Ces composés ont tendance à s'orienter plutôt au niveau du feuillet cytoplasmique. Enfin, le phosphatidylinositol compose 3-6% des phospholipides rétiens, il agirait en tant que constituant des domaines membranaires en agissant au niveau des cascades de signalisation (d'après la revue de SanGiovanni and Chew, 2005).

III.2 Production de médiateurs lipidiques à partir des acides gras polyinsaturés

Le dGLA, l'AA, l'EPA et le DHA sont des AGPI particulièrement intéressants puisqu'ils sont précurseurs de molécules biologiquement actives jouant le rôle de messagers cellulaires. Ces médiateurs lipidiques procurent aux AGPI une grande part de leur action pro ou anti-inflammatoire, neuroprotectrice (Calder, 2006) (Serhan et al., 2008), mais aussi anti-angiogénique (Serini et al., 2011). Les AGPI des phospholipides membranaires sont libérés dans le cytoplasme par hydrolyse de la liaison ester par une phospholipase A2 (PLA2) cytosolique dépendante (cPLA2) ou indépendante du calcium (iPLA2). Les AGPI sous forme libre peuvent alors entrer dans deux voies métaboliques distinctes. La voie des cyclooxygénases (COX) conduit à la formation des prostaglandines (PG), prostacyclines (PGI), thromboxanes (TX) et résolvines (Rv). La voie des lipoxygénases (LOX) conduit à la formation de leucotriènes (LT) mais aussi de résolvines et de protectines (Phillis et al., 2006). Les PG, PGI, TX et LT appartiennent à la famille des eicosanoïdes et sont caractérisés par une chaîne carbonée contenant 20 atomes de carbones.

➤ La voie de la cyclooxygénase

Il existe deux formes de COX, la COX1 dite constitutive et la COX2 dite inductible. Les COX permettent la synthèse des prostanoïdes (PG et PGI) des séries 1, 2 et 3 à partir, respectivement du dGLA, de l'AA et de l'EPA (*Figure 17*). Il est intéressant de souligner que les eicosanoïdes de la série 2 sont les produits majoritaires de la COX car celle-ci présente une affinité plus importante avec l'AA qu'avec les autres AGPI (Phillis et al., 2006).

Les résolvines sont des molécules anti-inflammatoires produites par un mécanisme utilisant le cytochrome P450 comme cofacteur (Capdevila et al., 1996). Lors d'un traitement avec l'aspirine, l'EPA et le DHA peuvent également être convertis par la COX respectivement en résolvines de la série E (type 18R) et D (type 17R) (Serhan et al., 2004). La résolution précise du métabolome des oméga 3 a récemment été explicitée (Serhan, 2014). En effet, la biosynthèse des résolvines de série E serait initiée par l'insertion d'une molécule d'oxygène au niveau du carbone 18 de l'EPA produite par les cellules endothéliales humaines hypoxiques, par la COX-2 acétylée ou le cytochrome p450. La résolution de ce métabolome comprendrait également l'activation de la lipoxygénation au niveau du carbone 17 du DHA par abstraction d'hydrogène. Le 17S-HpDHA serait alors converti en résolvine-époxyde contenant des composés intermédiaires qui seraient ensuite transformés en résolvines D1 à D4 par les neutrophiles humains. L'intermédiaire 17S-HpDHA serait aussi un précurseur des 16,17-époxydes-protectines, qui seraient convertis en protectine D1/neuroprotectine D1 par les neutrophiles, les lymphocytes T, les cellules neurales, et les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. Enfin, les marésines représentent un autre type de médiateur aux propriétés antinflammatoires impliqué dans ce métabolome. Elles seraient produites par une lipoxygénation initiale. Ceci comprend l'insertion d'une molécule d'oxygène au niveau du carbone 14 afin de former un intermédiaire qui serait rapidement converti en 13S,14S-époxyde-marésine. Ce composé est enfin enzymatiquement converti en marésine-1 (*Figure 18 : Mécanismes de biosynthèse des résolvines, protectines et marésines à partir de l'EPA et du DHA*

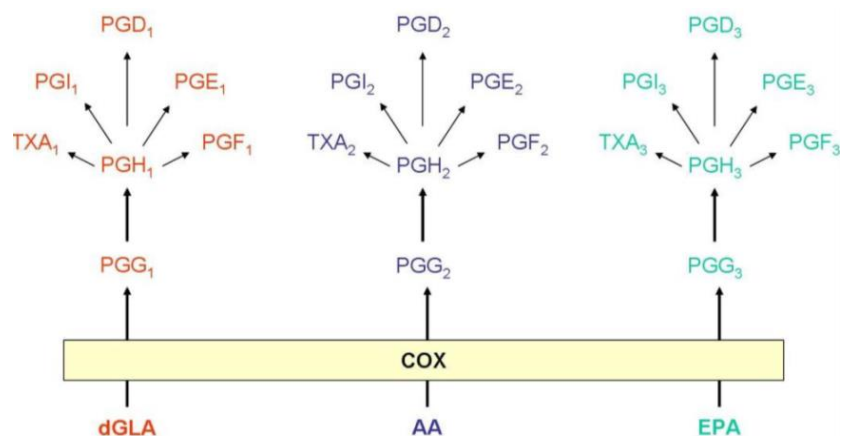


Figure 17 : Représentation schématique de la synthèse des eicosanoïdes via la voie de la cyclooxygénase

dGLA= acide dihomog γ -linolénique, AA= acide arachidonique et EPA= acide eicosapentaénoïque, PG= prostaglandine.

Adapté de Calder (Calder, 2006).

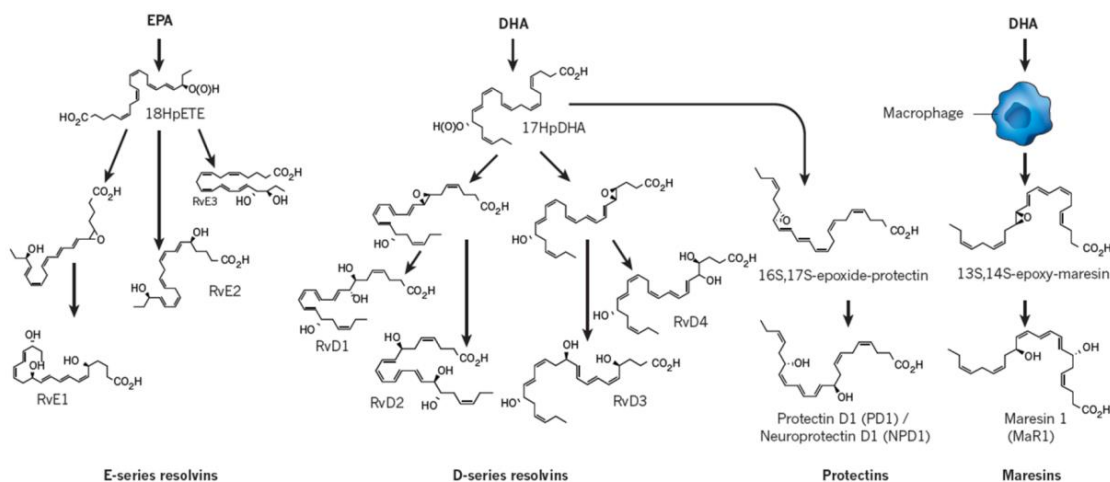


Figure 18 : Mécanismes de biosynthèse des résolvines, protectines et marésines à partir de l'EPA et du DHA

D'après (Serhan, 2014).

➤ *La voie de la lipoxygénase*

On distingue trois types de LOX : la 5-LOX, la 12-LOX et la 15-LOX. Celles-ci conduisent à la formation d'acides gras hydroperoxydés (HPETrE, HPETE et HPEPE), puis d'acides gras peroxydés (HETrE, HETE et HEPE), respectivement de type 5, 12 et 15. Les leucotriènes formés à partir de la 5-LOX sont répartis en trois classes selon l'AGPI précurseur. Ainsi, le dGLA est métabolisé en LT de la série 3 (LT₃), l'AA donne naissance aux LT de la série 4 (LT₄) et enfin l'EPA mène à la formation de LT de la série 5 (LT₅) (Phillis et al 2006) (*Figure 19*). Le DHA peut également être métabolisé en résolvines de la série D (type 17S) et en protectines dont la neuroprotectine D1 (NPD1) par la 15-LOX (*Figure 18*) (Serhan et al., 2004).

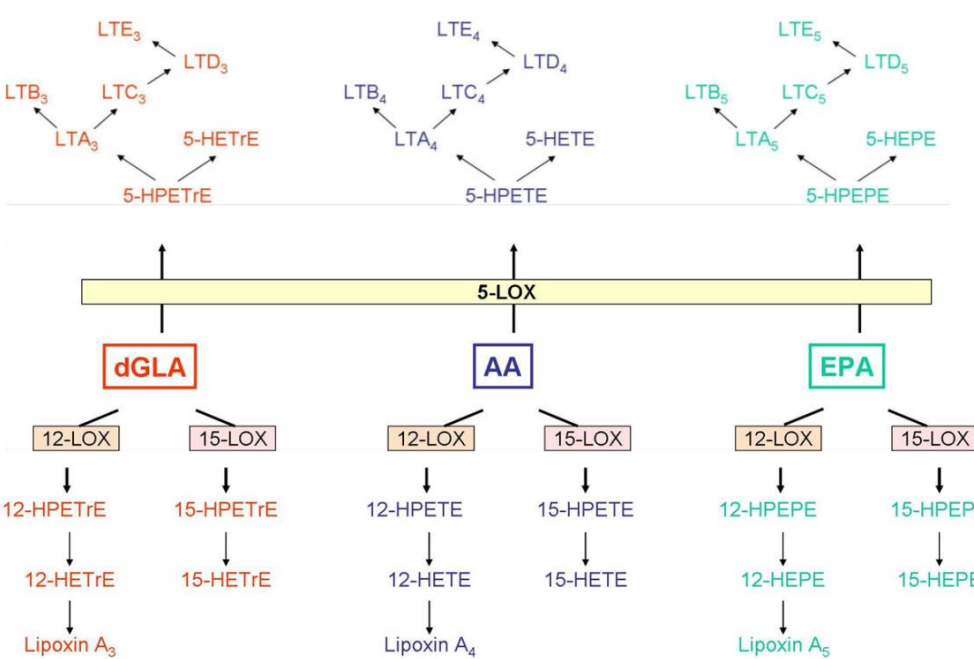


Figure 19 : Représentation schématique de la synthèse des eicosanoïdes via la voie des lipoxygénases (LOX)

AA= acide arachidonique, dGLA= acide dihomog-γ-linolénique, et EPA= acide eicosapentaénoïque, LT= leucotriène.

Adapté de (Calder, 2006).

III.3 Les sources alimentaires d'AGPI-LC oméga 3 et apports nutritionnels conseillés

Parmi les différentes sources alimentaires d'oméga 3, les poissons et fruits de mer représentent les sources majeures d'EPA et de DHA. Les poissons gras vivant en eaux froides sont particulièrement riches en oméga 3. Parmi les poissons les plus riches, nous retrouvons principalement le saumon sauvage, le flétan, le hareng, l'anchois, le maquereau ou encore la sardine. Les poissons assimilent les oméga 3 à partir de leur propre alimentation, en effet, les algues et micro algues sont très riches en DHA et constituent aujourd'hui directement une source à fort potentiel. Parmi les algues non océaniques, la spiruline (cyanobactérie appartenant à la classe des algues bleues) constitue une source potentielle d'oméga 3 tout comme la schizotrium qui détient notamment un taux record de 32% de DHA. Les algues rouges quant à elles sont constituées principalement d'EPA.

Par ailleurs, le lin constitue une source végétale d'oméga 3 non négligeable, son huile avoisinant les 58% d'acide alpha linolénique (ALA). D'autres huiles sont aussi réputées pour leur richesse en ALA telles que l'huile de colza, l'huile de noix, l'huile de soja, l'huile de chanvre. Enfin, les légumes verts à feuilles tels que la mâche, le chou, la laitue contiennent également des teneurs relativement importantes en ALA mais leur faible teneur en lipides en font des sources marginales en ALA.

En termes d'apports nutritionnels conseillés (ANC) pour la population française, les acides gras ont fait l'objet d'une réévaluation par l'ANSES. Ainsi, selon l'avis formulé le 1^{er} mai 2011, les besoins physiologiques minimaux en acides gras indispensables et conditionnellement indispensables, correspondent à un apport nécessaire afin d'assurer un bon fonctionnement de l'ensemble de l'organisme, en particulier le développement et le fonctionnement cérébral. Il est important de noter que le DHA est désormais considéré comme indispensable tout comme les acides linoléique et alpha linolénique, en raison de la faible capacité de l'organisme humain à le synthétiser de novo en quantité suffisante. D'un point de vue préventif, sur le plan physiopathologique, on parle alors de besoins physiologiques optimaux. Les pathologies suivantes ont été incluses dans ces nouvelles recommandations : syndrome métabolique, diabète, obésité, maladies cardiovasculaires, cancer (du sein et du colon) et DMLA (*Tableau 4*).

Tableau 4 : Apport nutritionnels conseillés en oméga 3

Pour un adulte consommant 2000kcal/j, exprimés en pourcentage de l'apport énergétique total pour l'ALA et en mg pour l'EPA et le DHA

(Avis de l'AFSSA – saisine n°2006-SA-0359. AFSSA. Maisons-Alfort, France, 2011)

	Besoin physiologique minimal	Prévention					ANC 2010
		Syndrome métabolique, diabète, obésité	Pathologies cardio vasculaires	Cancers du sein et du côlon	Pathologies neuropsychiatriques	DMLA	
ALA	0.8%	1%	1%	0.8%	0.8%	0.8%	1%
EPA	-	500mg	500-700mg	500mg	≥ 200-300mg	500mg	250mg
DHA	250mg						250mg

III.4 Transport et accréation des AGPI-LC dans la rétine

Les acides gras existent principalement sous forme estérifiées dans l'alimentation au sein des triacylglycerols (huiles et corps gras) et dans une moindre mesure au sein des phospholipides (produits animaux en particulier). Au cours des premières phases d'absorption des lipides, les acides gras libres sont clivés à partir de la position sn-1 et sn-3 des TG par la lipase pancréatique au niveau de l'intestin. Les AGPI libres et les complexes de monoacylglycerols issus de ces AGPI, sont ensuite réestérifiés en TG et phospholipides au sein des entérocytes dans l'épithélium intestinal. TG et PL sont ensuite intégrés sous forme de chylomicrons natifs, sécrétés dans le système lymphatique. Ils rejoignent le système circulatoire par la veine cave via le canal thoracique jusqu'au foie. Le foie par ailleurs, est le site principal pour la synthèse de lipoprotéines, et principalement des VLDL. TG et cholestérol sont alors associés avec l'apolipoprotéine B-100 (ApoB100) pour former des VLDL, qui sont relargués ensuite dans la circulation sanguine par un processus dépendant d'ApoB100. Une fois la particule native de VLDL prise en charge par les apolipoprotéines C-II et E, elle est alors considérée comme mature. L'apolipoprotéine C-II active notamment la lipoprotéine lipase, entraînant l'hydrolyse de la

particule VLDL et la libération d'acides gras et de glycérol. Ces produits peuvent alors être absorbés depuis la circulation sanguine vers les tissus périphériques.

En particulier dans la rétine, les LDL et VLDL constitueraient les principaux vecteurs pour le transport des acides gras et notamment du cholestérol. La rétine serait en effet capable d'absorber rapidement les LDL circulants via un processus médié par les récepteurs au LDL (LDL-R) dans l'EPR mais également au niveau des cellules de Müller (Tserentsoodol et al., 2006). D'autre part, les esters de cholestérol sont les lipides prédominants dans les LDL, représentant plus de la moitié de leur masse lipidique (Teerlink et al., 2004). Ils pourraient donc constituer une voie majeure de l'apport des acides gras d'origine alimentaire dans la rétine (Bretillon et al., 2008). La biosynthèse du DHA dans la rétine est lente et insuffisante pour assurer le besoin en DHA des photorécepteurs qui disposent d'une capacité à synthétiser le DHA très limitée (Wetzel et al., 1991) (Wang and Anderson, 1993). Le DHA d'origine cellulaire est synthétisé principalement au niveau du foie (Li et al., 2001), il sera finalement estérifié au sein des phospholipides et formera des complexes avec des apoprotéines. Ces complexes sont transportés par des vésicules de Golgi où ils sont assemblés, puis sécrétés sous forme de VLDL. Ce DHA d'origine cellulaire est alors transporté avec le DHA d'origine alimentaire via des lipoprotéines VLDL jusqu'au niveau de la choriocapillaire. Les AGPI arrivent ainsi au niveau du RPE et des segments internes des photorécepteurs via un processus de transport médié par un récepteur. Ils entrent précisément au niveau de la myoïde, une aire adjacente à la base des segments externes, qui montre une préférence pour l'incorporation du DHA. Ensuite, une dégradation enzymatique au niveau du segment interne et une activation du coenzyme A interviennent menant à une ré-esterification du DHA en acide phosphatidique. Un processus de biosynthèse de novo des phospholipides, diglycérides et triglycérides intervient. Les phospholipides contenus dans le DHA sont ensuite intégrés en tant que composés structuraux des membranes des disques des photorécepteurs à proximité des molécules de rhodopsine (d'après revue de SanGiovanni and Chew, 2005).

III.5 Rôle de l'EPA et du DHA dans la rétine

III.5.1 Rôle structural

Le DHA représente 30% des acides gras totaux de la rétine (Bretillon et al., 2008). Les fortes proportions de DHA présentes confèrent aux membranes des propriétés à la fois biophysiques (dynamique membranaire, fluidité, perméabilité, épaisseur) et biochimiques (en tant que source primaire de molécules de signalisation). Elles influencent également fortement la dynamique de la communication inter et intracellulaire (Litman and Mitchell, 1996).

En particulier, le DHA est un acide gras majeur des lipides structuraux constituant les membranes des segments externes des disques des photorécepteurs (Fliesler and Anderson, 1983). Les différentes espèces de phospholipides au sein des segments externes des photorécepteurs comprennent 40% de PE, 12% de PS, 10% de PC, chez les mammifères. le DHA compose environ 20% des PC, 30% des PE et des PS (Anderson, 1970). La composition des segments externes des photorécepteurs est unique avec 80 à 90% de glycérophospholipides et 8 à 10% de lipides neutres (Daemen, 1973). Les lipides neutres retrouvés à ce niveau sont principalement du cholestérol, ainsi qu'une faible proportion d'acides gras libres (Bretillon et al., 2008). Les phospholipides de la rétine peuvent posséder des AGPI soit en position sn-1 ou sn2 de la molécule de glycérol.

III.5.2 Déficiences en DHA, conséquences fonctionnelles et statut tissulaire

Les déficiences en DHA apparaissent étroitement associées avec des dysfonctionnements structuraux et fonctionnels du système visuel (Uauy et al., 2000) (Uauy et al., 2001). Des études menées chez des rongeurs et des primates ont notamment montré l'existence d'une différence dans la forme des ondes de l'ERG en fonction de l'apport en n-3 par l'alimentation (Jeffrey et al., 2001). Des études menées sur des primates ont également rapporté une altération de l'acuité visuelle fonction de l'apport en AGPI-LC alimentaires. Enfin, des études cliniques sur des enfants prématurés ou non ont mis en évidence des différences dans la résolution de l'acuité

visuelle entre 2 et 4 mois qui iraient en faveur d'une supplémentation en DHA (d'après les revues de SanGiovanni et al., 2000a, SanGiovanni et al., 2000b).

D'autre part, de nombreux facteurs génétiques, métaboliques et comportementaux pourraient influencer également le statut tissulaire et l'absorption du DHA.

Si l'on considère les pathologies de dégénérescences rétinienne héréditaires, la rétinite pigmentaire (RP), est une pathologie définie notamment par une atrophie des photorécepteurs, une perte de la vision de nuit et une restriction des champs visuels périphériques (Hoffman et al., 2001). Des études menées sur des modèles animaux présentant ce type de pathologies ont montrées une diminution nette de la concentration en DHA des segments externes des photorécepteurs (Anderson et al., 2001). De plus, chez des patients souffrant de RP, les taux de DHA plasmatiques et érythrocytaires seraient aussi inférieurs (Anderson et al., 1999). Par ailleurs, certaines populations exprimant des atteintes du peroxysome, comme cela peut être le cas dans le syndrome de Zellweger ou dans les leucodystrophies néonatales, présentent généralement des désordres importants du métabolisme des AGPI-LC. Ces déficits visuels pourraient être améliorés par une supplémentation en AGPI-LC de type oméga 3 (Martínez et al., 2000). Nous ne disposons malheureusement pas de suffisamment de données à l'heure actuelle qui permettraient de justifier si c'est bel et bien la diminution de DHA qui serait à l'origine de ces dégénérescences rétinienne ou s'il s'agit à l'inverse d'une conséquence de ces atteintes.

III.5.3 Importance dans les mécanismes de phototransduction

Le mécanisme de phototransduction tel que décrit précédemment (*Figure 5*) implique la transformation de la molécule de rhodopsine en sa forme active la métarhodopsine II (M-II), étape essentielle du mécanisme de phototransduction (Litman and Mitchell, 1996). Le DHA favoriserait cette activation, l'activation du complexe (MII)-transducine serait en effet amélioré par 2 fois dans un système riche en DHA plutôt qu'en AGS ou AGMI (Salem et al., 2001), indiquant l'efficacité d'interactions entre ce complexe et des membranes riches en DHA. Des relations similaires ont également été observées concernant l'activité de la phosphodiesterase, ayant pour fonction principale l'hydrolyse du GMPc (Litman et al., 2001). Enfin, le DHA jouerait un rôle primordial dans la régénération de la rhodopsine, il participerait au transport du 11-cis-

rétinal (composant de la rhodopsine) permis notamment par la protéine de liaison rétinienne interphotoréceptrice (IRBP) à partir de l'EPR (Chen et al., 1996).

III.5.4 Expression génique

Le DHA est un ligand des récepteurs hormonaux nucléaires du peroxyosome PPAR (Lin et al., 1999) et RXR (de Urquiza et al., 2000). Il se lie en effet spécifiquement aux motifs de l'ADN présents sur les éléments cis-régulés des régions promotrices de gènes cibles. Celui-ci module alors l'activation des récepteurs de PPAR et RXR qui agissent habituellement en tant que facteurs de transcription (Göttlicher et al., 1993). Le DHA est susceptible d'affecter plusieurs isoformes des récepteurs PPAR incluant α , β et γ (Dreyer et al., 1993) (Göttlicher et al., 1993), il peut agir également directement au niveau de la transcription (Salem et al., 2001). Enfin le DHA peut intervenir à un niveau post-transcriptionnel en agissant en tant que ligand, induisant des changements dans les événements de phosphorylation de l'ARNm natif, mais aussi au niveau de son transport de sa stabilisation ou encore de son taux de dégradation (Uauy et al., 2000).

III.6 Oméga 3 et Syndrome Métabolique

Les individus présentant un syndrome métabolique ont un plus fort risque de développer un diabète de type 2 ou encore des pathologies cardiovasculaires. L'inflammation chronique constituerait un facteur à la fois contributeur et associé du syndrome métabolique. En effet, un état de faible inflammation chronique dans le cadre d'un syndrome métabolique serait caractérisé par la sécrétion anormale de cytokines pro et anti inflammatoire dérivées du tissu adipeux (TNF- α), d'interleukines (IL-6, IL-8, IL-10) de protéine réactive C (CRP) et d'adipokines (adiponectine, leptine, resistine). Bien que l'inflammation ne fasse pas clairement partie intégrante du diagnostic clinique du SMet, il contribuerait au développement de dysfonctionnements métaboliques, tel que l'insulinorésistance (Romeo et al., 2012) (Kalupahana et al., 2012). Différentes études épidémiologiques, humaines, animales et sur cultures cellulaires ont montré un intérêt grandissant des AGPI-LC (ALA, EPA et DHA) sur l'amélioration des composantes associées au SMet et en particulier sur ces composantes inflammatoires.

Les récentes études observationnelles chez des patients sains rapportent un effet intéressant sur la diminution du taux de CRP lors de la consommation régulière de poissons gras, ou lors de régime

riches en n-3. En revanche, les études interventionnelles menées dans les 5 dernières années sur patients sains supplémentés avec une combinaison d'ALA, EPA, DHA, ne rapportent pas de différences entre groupes supplémentés et non supplémentés (d'après la revue de Robinson and Mazurak, 2013). Si l'on s'intéresse à présent aux patients présentant un SMet, les études interventionnelles menées montrent qu'un enrichissement en ALA ne semble pas avoir d'effet sur les taux d'IL-6, de CRP, ou encore de MCP1 (Faintuch et al., 2007) (Bloedon et al., 2008) (Dewell et al., 2011). L'étude interventionnelle de Ramel (Ramel et al., 2010) sur 324 patients avec un IMC>27,5 supplémentés par une alimentation riche en AGPI-LC de type oméga 3 montre une diminution intéressante des différents paramètres inflammatoires (CRP, IL-6, PGEF2 α). D'autres études interventionnelles suggèrent également un effet d'une supplémentation en oméga 3 sur les taux de CRP et de TNF α chez des adultes hyperlipidémiques (Micallef et al., 2009) ou encore sur les taux d'adiponectine chez de jeunes obèses (Sneddon et al., 2008). L'effet des AGPI-LC sur l'inflammation dans le cadre d'un SMet semble à priori avéré, suggérant cependant qu'un état pré-inflammatoire ou un statut déficient en oméga 3 doit être requis pour visualiser véritablement un effet sur ces composantes.

D'autre part, l'utilisation d'huile de poisson riche en oméga 3 aiderait à diminuer le taux de triglycérides plasmatiques, de lipoprotéines de basse densité (VLDL) et la pression artérielle. Combinés à une activité physique régulière et à un mode de vie sain, les oméga 3 permettraient de réduire considérablement le risque de pathologies cardiovasculaires inhérentes au SMet (Soares et al., 2014).

III.7 Oméga 3 et pathologies rétiniennes

III.7.1 Oméga 3 et Rétinopathie diabétique

Le métabolisme du glucose est étroitement lié au métabolisme des lipides. En effet de nombreuses interactions existent entre acides gras et système endocrinien, les hormones affectant à la fois le métabolisme des acides gras et leur composition au sein des tissus riches en lipides. Les principales hormones impliquées dans le métabolisme des lipides sont l'insuline, le glucagon, les catécholamines. Récemment les hormones thyroïdiennes ont également été mises en évidence pour leur rôle central dans ce métabolisme (Mullur et al., 2014). Les concentrations de ces hormones sont particulièrement altérées en conditions dégénératives chroniques tel qu'un diabète,

ce qui conduit à l'altération des tissus riches en lipides. La lipogénèse et la lipolyse, qui modulent les concentrations en acides gras du plasma et des tissus sont sous contrôle hormonal. D'autre part, les neuropeptides sont impliqués dans le métabolisme lipidique du cerveau et de tissus tels que la rétine. Les AGPI sont aussi les précurseurs des eicosanoïdes incluant prostaglandines, leukotriènes et thromboxanes qui possèdent des activités hormonales. Ainsi, les acides gras sont susceptibles d'interagir à la fois au niveau hormonal et au niveau des concentrations de neuropeptides. Récemment, une revue s'est notamment focalisée sur les différents liens existants entre métabolisme des eicosanoïdes, inflammation persistante et altération du métabolisme des glucides dans le cadre d'un SMet (d'après la revue de Hardwick et al., 2013). Ainsi, il a été montré que les acides gras saturés et trans diminueraient les concentrations d'insuline plasmatiques menant à l'installation d'une insulino-résistance. A l'inverse les AGPI augmenteraient les concentrations plasmatiques d'insuline et diminueraient l'insulino-résistance (Bhathena, 2000).

Parmi les différents facteurs étiologiques de la RD, les différentes actions putatives des AGPI-LC omega 3 ont été mises en évidence (d'après la revue de SanGiovanni and Chew, 2005). Les AGPI LC oméga 3 disposeraient tout d'abord d'un rôle modulateur au niveau des procédés immunitaires et inflammatoires. Leur action interviendrait au niveau des cytokines pro-inflammatoires, considérant l'inhibition de la synthèse de leukotriène B4. L'EPA agirait au niveau de la voie des PKC susceptible d'être impliquée dans les dysfonctionnements vasculaires liés au diabète en modulant les taux de DAG (Kuroki et al., 1998). L'EPA et le DHA interviendraient aussi en protégeant la dégénérescence des péricytes (de Wilde et al., 2002). De manière plus générale, ils agiraient au niveau des altérations cellulaires endothéliales inhérentes à la pathologie, en luttant contre la production d'AGE (El-seweidy et al., 2002) et en atténuant la production de VEGF (Yang et al., 1998). Enfin, le DHA permettrait de limiter la toxicité du glucose en favorisant son absorption lors de la libération d'insuline au niveau intestinal (Onuki et al., 2000).

Récemment, une étude a notamment suggéré l'importance d'une prévention par des AGPI-LC EPA et DHA afin de ralentir la perte de la vision chez des souris atteintes de diabète de type 2 (Sapieha et al., 2012). Des données rapportent également que résolvines, lipoxines et protectines apporteraient un bénéfice significatif dans la prévention de l'œdème maculaire diabétique et de la

RD (Das, 2013). Enfin, une étude menée chez le rat soumis à des injections de streptozotocine a montré un effet intéressant de l'ALA face à l'inflammation, au stress oxydatif, à la sécrétion de facteurs de croissances vasculaires générés dans la DR. Cette étude renforce l'importance de considérer également l'ALA dans un but préventif (Shen et al., 2013). Ces études principalement menées sur le modèle animal demandent cependant à être confirmées d'un point de vue clinique.

III.7-2 Oméga 3 et rétinopathie du prématuré (ROP)

Parmi les différents facteurs influençant les phénomènes de vascularisation anormale il a été montré que les AGPI-LC oméga 3 seraient susceptibles de prévenir le développement vasculaire rétinien anormal au cours de la rétinopathie des prématurés (Connor et al., 2007) (Leduc et al., 2007). D'un point de vue moléculaire, il semblerait que les acides gras polyinsaturés modulent les voies d'activation de l'IGF-1 (Atribat et al., 2000) et la prolifération de cellules endothéliales induite par le VEGF (Calviello et al., 2004). Ces voies de signalisation seraient en effet impliquées dans la physiopathologie de la rétinopathie du prématuré (Hellstrom et al., 2001) (Smith, 2004) (Smith, 2005). Il semblerait par ailleurs que IGF-1 et le VEGF interagiraient *via* la voie de signalisation de la PI-3K/AKT (Hellstrom et al., 2001). Des travaux menés par l'équipe de L. Smith et al à Boston ont suggéré qu'une supplémentation alimentaire en AGPI oméga 3 protégerait du développement et de la progression de la néovascularisation rétinienne induite dans un modèle ROP induit par l'oxygène chez la souris, ceci par l'intermédiaire de la NDP1 et des résolvines. Venant conforter cette idée, une étude menée par l'équipe de Bazan, a montré en particulier, que l'augmentation de la phosphorylation d'Akt était médiée par la NPD1. Ainsi, en augmentant sa phosphorylation la NPD1 permettrait de maintenir la survie cellulaire via les voies PI3K/AKT et mTOR/p70S6K (Halapin and Bazan, 2010).

III.7-3 Oméga 3 et DMLA

De nombreuses raisons biologiques plausibles ont amené à suggérer qu'une augmentation en oméga 3 d'origine alimentaire serait judicieuse dans le cadre des pathologies de la MLA et de la DMLA. D'une part, le renouvellement constant des segments externes des photorécepteurs requiert un apport en DHA ou en ses précurseurs, une déficience pouvant prédisposer à développer ces pathologies. D'autre part, les AGPI-LC de type oméga 3 pourraient conférer une protection contre le stress oxydatif, l'inflammation et les atteintes vasculaires qui apparaissent

jouer un rôle clé dans le pathogénèse de la DMLA (Bjelakovic et al., 2012) (Kishan et al., 2011). Des études observationnelles menées chez l'Homme ont rapporté que la consommation de poisson ou de nourriture riche en AGPI-LC oméga 3 pourrait permettre de réduire le risque de développer une DMLA (Chong et al., 2009) (Christen et al., 2011).

Selon le rapport n°30 de l'étude prospective AREDS, les patients ayant eu la plus forte consommation d'AGPI-LC oméga 3 (0,11% de l'apport énergétique total) bénéficieraient de 30% de risque en moins de développer une atrophie géographique (OR=0,65) ou une DMLA non vasculaire (OR=0,68) comparé aux patients ayant la plus faible consommation d'AGPI-LC oméga 3 (Sangiovanni et al., 2009). Plus récemment une étude confortant cette idée a montré qu'une consommation d'oméga 3 serait associée à un risque réduit de développer une atrophie géographique (Reynolds et al., 2013). En revanche, une autre étude menée par électrorétinographie n'a pas montré d'amélioration significative des fonctionnalités rétinienne dans le cadre d'une DMLA sèche chez des patients supplémentés avec de fortes doses d'oméga 3 (840 mg d'EPA et 2520 mg de DHA par jour) pendant 6 mois (Gerstenblith et al., 2013).

Par ailleurs, certains stades de DMLA avancée présentent des aspects de néovascularisation et de dégénérescence cellulaire qui seraient susceptibles d'être modulés par les AGPI oméga 3. De nombreuses études épidémiologiques se sont intéressées à la relation protectrice induite par une consommation de poisson ou d'AGPI-LC oméga 3 sur la prévalence des formes de DMLA. Celles-ci sont répertoriées dans la table ci-dessous (*Tableau 5*).

Tableau 5 : Récapitulatif des études cliniques étudiant l'effet des oméga 3 sur les MLA et DMLA

BDES : Beaver Dam Eye Study, BMES : Blue Mountains Eye Study, NHS/HPFU : Nurse Health Study/Health Professional Follow up, NHANES : National Health and Nutrition Survey, EDCCS : Eye disease Case-Control Study, AREDS : Age Related Eye Disease Study, POLANUT : Pathologies oculaires liées à l'âge et Nutrition

Etude	Type d'étude	Type d'exposition	Pathologie	Nombre de cas	Conclusions
BDES (Klein et al., 1996)	Population	Poisson	DMLA	30	Association non significative OR=0,8
BMES (Smith et al., 2000)	Population	Poisson	DMLA	46	Non significatif de manière générale
NHS/HPFU (Cho et al., 2001b)	Prospective	AGPI-LC	DMLA néovasculaire	567	Effet protecteur OR=0,8 Risque relatif augmenté sous consommation d'acide linoéique
NHANES, 2001	Etude Nationale (USA)	Poisson	DMLA	9	Non significatif OR=0,4
EDCCS (Seddon et al., 2001b)	Cas-contrôle	AGPI-LC	DMLA néovasculaire	349	Effet protecteur OR=0,5 Augmentation du risque si consommation d' n-6
AREDS (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2001)	Cas-contrôle	AGPI-LC	DMLA néovasculaire	658	Effet protecteur OR=0,5
REYKJAVIK	Population	Poisson	MLA-DMLA	126	Effet protecteur

EYE STUDY (Arnasson et al., 2006)				MLA 8 DMLA	OR=0,61
POLANUT (Delcourt et al., 2007)	Population	Poisson	MLA-DMLA	38 MLA 10 DMLA	Effet protecteur OR= 0,64

Parmi les études les plus récentes, l'étude AREDS2 qui a débuté en octobre 2006, avait pour but de se focaliser notamment sur le rôle des AGPI oméga 3 dans le développement et la progression de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (4000 patients). Cette étude a montré que l'apport d'1 gramme d'AGPI omega 3 (DHA/EPA : 350/650 mg par jour) ne présentait aucun effet sur la progression de la DMLA (Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group, 2013).

En revanche, l'étude NAT-2 a montré que la consommation d'AGPI oméga 3 (DHA/EPA : 840/270 mg par jour) induisait une augmentation significative des niveaux membranaires en oméga 3 (+70%, $p < 0,001$). Cette étude révèle de plus, que le risque de développer une DMLA exsudative sur 3 ans était significativement plus faible chez les patients ayant atteint les niveaux membranaires les plus élevés en oméga 3, (68%, $p = 0,047$; HR = 0,32 ; IC = 0,10 à 0,99) (Souied et al., 2013).

Cet effet protecteur apparaîtrait donc controversé selon les études. Il est certes dépendant de l'apport en oméga 3 du poisson. Il varierait également en fonction de l'apport en AGPI oméga 6 dans l'alimentation, du fait de la compétition enzymatique existante entre ces deux familles. Il serait donc aussi dépendant du statut lipidique de l'individu et pose finalement la question de la nécessité d'une supplémentation en fonction des apports et des besoins réels du patient.

Chapitre 2

Caractérisation de l'adaptation de la rétine à un régime diabétogène à court terme

I-Problématique

Notre société est confrontée à une épidémie de diabète grandissante, intrinsèquement liée à l'augmentation de la prévalence du syndrome métabolique au sein des populations. La rétinopathie diabétique constitue une complication microvasculaire liée au diabète qui survient en moyenne après 15 ans d'évolution. À ce jour, beaucoup d'études se sont intéressées à comprendre les mécanismes physiologiques de la rétinopathie diabétique mais seulement quelques-unes se sont penchées sur la question d'éventuelles altérations de la rétine bien avant la mise en place réelle de la pathologie. Cependant, selon certains auteurs, il apparaît certain que les fonctionnalités de la rétine neurale seraient atteintes bien avant la manifestation de lésions vasculaires (Antonetti et al., 2006) (Adams and Bearse, 2012) (Bronson-Castain et al., 2012) (Fortune et al., 1999) (Shoji et al., 2011).

Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse qu'un régime diabéto-gène chez le rat serait possiblement susceptible d'induire au bout de quelques jours des altérations de la rétine et une modification de son homéostasie.

Afin de vérifier cette hypothèse, des rats Brown Norway ont été soumis pendant des durées à très court termes de 3 et 8 jours, soit à un régime enrichi à 60% de fructose, soit à un régime standard. Dans ces travaux, l'adaptation du métabolisme de l'animal à ces régimes a été vérifiée. Cette étude s'est ensuite principalement focalisée sur l'analyse des fonctions rétinienne et l'expression des gènes dans la rétine.

Les résultats de ces travaux font l'objet d'une soumission dans le journal *Experimental Eye Research*.

II-Article

Early adaptive response of the retina to a pro-diabetogenic diet: cone sensitivity impairment and gene expression changes in high- fructose fed rats

Magalie THIERRY^{1,2,3}, Bruno PASQUIS^{1,2,3}, Bénédicte BUTEAU^{1,2,3}, Doulaye DEMBELE^{4,5,6,7},
Laurent LECLERE^{1,2,3}, Ségolène GAMBERT-NICOT^{1,2,3,8}, Niyazi ACAR^{1,2,3}, Alain M.
BRON^{1,2,3,9}, Catherine P. CREUZOT-GARCHER^{1,2,3,9}, Lionel BRETILLON^{1,2,3}

1 INRA, UMR1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Eye and Nutrition Research Group, F-21000 Dijon, France

2 CNRS, UMR6265 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France

3 Université de Bourgogne, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France

4 INSERM, UMR964 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), F-67404 Illkirch, France

5 CNRS, UMR7104 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), F-67404 Illkirch, France

6 Université de Strasbourg, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), F-67404 Illkirch, France

7 IGBMC, Microarray and Sequencing Platform, F-67404 Illkirch, France

8 University Hospital, Department of Clinical Chemistry, F-21000 Dijon, France

9 University Hospital, Department of Ophthalmology, F-21000 Dijon, France

* to whom correspondence should be addressed at: Lionel Bretillon, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Centre INRA, 17 rue Sully, BP86510, F-21065 Dijon cedex, France. Phone: +33(0)380693121, lionel.bretillon@dijon.inra.fr

Abstract

The incapacity of neurons to respond to dietary changes, such as high fat and high fructose diets, by modulating gene and protein expression has been associated to functional and behavioral impairments that can have detrimental consequences. Feeding rodents with high fructose is a recognized and widely used model to trigger obesity and metabolic syndrome. However the adaptive response of the retina to short term feeding with high fructose is poorly documented. We therefore aimed to characterize both the functional and gene expression changes in the neurosensory retina of Brown Norway rats fed during 3 and 8 days with a 60%-rich fructose diet ($n=16$ per diet and per time point). Glucose, insulin, leptin, triacylglycerols, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and fructosamine were quantified in plasma ($n=8$ in each group). Functionality of the inner retina was studied using scotopic single flash electroretinography ($n=8$ in each group) and sensitivity of photoreceptors recorded using 8Hz Flicker electroretinography ($n=8$ in each group). Analysis of gene expression in the neurosensory retina was performed by Affymetrix genechips, and confirmed by RT-qPCR ($n=6$ in each group). Elevated glycemia (+13%), insulinemia (+83%), and leptinemia (+172%) was observed after 8 days of fructose feeding. The sensitivity of cone photoreceptors to light stimulus was partially lost at day 8 in high fructose fed rats ($\Delta=0.5$ log unit of light stimulus intensity). Affymetrix analysis of gene expression highlighted significant modulation of the pathways of eIF2 signaling and endoplasmic reticulum stress, regulation of eIF4 and p70S6K signaling, as well as mTOR signaling and mitochondrial dysfunction. RT-qPCR analysis confirmed the down regulation of *Crystallin*, *Npy*, *Nid1* and *Optc* genes after 3 days of fructose feeding, and up regulation of *End2*. Our results are consistent with early alterations of the functioning and gene expression in the retina in a pro diabetogenic environment.

Key words: fructose; retina; diet; gene expression; electroretinography

Highlights

- High fructose diet elevated plasma glucose, insulin and leptin at day 8 of feeding
- High fructose diet impaired cone sensitivity at day 8 of feeding in the rat
- Endothelin 2 gene was overexpressed in the retina at day 3 of high fructose feeding
- 19 genes were modulated in the retina at day 3 of feeding with high fructose
- High fructose diet regulated eIF2 signaling and ER-stress pathways in the retina

1. Introduction

It is now considered as a postulate that long term adaptation to the environment is a key driver for the origin and evolution of living species. In *On the Origin of Species* published in 1859, Charles Darwin suggested that “It is not the strongest of the species that survive, nor the most intelligent, but the one most responsive to change” (Darwin, 1859). Among other powerful environmental factors, the ability to meet nutritional requirements by adapting to new foods plays a crucial role in the origin and evolution of species (Verginelli et al., 2009). More recently the early adaptation to dietary factors has emerged as an important contributor to behavioral and metabolic changes. It was shown that a high fat diet rewired hypothalamic neurons in the time frame of three days only. Moreover, the inhibition of this rewiring mechanism limited the metabolic adaptation of mice to high fat diet, leading to obesity (Benani et al., 2012). In conjunction with high fat, dietary high fructose induced short term insulin signaling and neuronal changes in the hippocampus after seven days of feeding (Calvo-Ochoa et al., 2014). In the retina, neuronal defects were the earliest detectable changes in diabetes, before the onset of vascular alterations. Functional changes have been suggested to be more sensitive indicators of retinal integrity than clinical ophthalmological endpoints (Antonetti et al., 2006). As recently reviewed by Abcouwer and Gardner, changes in the electroretinographic response including loss of photoreceptor light sensitivity have been reported in diabetic patients without diabetic retinopathy (Abcouwer and Gardner, 2014). Far less is known on the very early functional and gene expression changes in the retina in the context of pre diabetic states, such as obesity and metabolic syndrome that remain important risk factors for diabetes (Alberti et al., 2009). We therefore aimed to characterize the functional and gene expression changes in the retina of rats fed a high fructose diet after short term periods of feeding, accounting that feeding rodents with high fructose diets is a recognized and widely used model to trigger obesity and correlative metabolic syndrome (Dekker et al., 2010).

2. Materials and Methods

2.1. Ethical concerns

All procedures were conducted in accordance with the ARVO Statements for the use of animals in ophthalmic and vision research and were approved by the local Animal Care and Use Committee (Comité d’Ethique de l’Expérimentation Animale C2EA nr 105, Dijon, France).

Personal (nr 21CAE095) and institutional (nr B21231010EA) agreements were obtained according to French regulations.

2.2 Experimental diets

Standard and 60%-rich fructose diets (Table 1) were purchased from Sniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Germany).

2.3 Animals

Male Brown Norway rats ($n=64$, 6 weeks of age, Charles River, L'Arbresle, France) were housed in controlled temperature ($22\pm1^{\circ}\text{C}$) and humidity (55-60%) conditions with a 12-h light/12-h dark cycle. After a 7-day-long quarantine, the animals were randomly allocated to the experimental groups corresponding to the feeding of either of the two experimental diets during 3 or 8 days ($n=16$ per diet and per time point). Rats had unrestricted access to food and deionized tap water.

2.4 Electroretinography

The electroretinograms (ERG) were recorded after 3 and 8 days of feeding ($n=16$ rats per group), according to previously described procedures and International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) guidelines (Jaissle et al., 2001). Rats were dark-adapted overnight before the experiments. All further procedures were carried out under dim red light ($\lambda < 650$ nm) at a constant temperature of 25°C . Rats were anesthetized by intramuscular injection of ketamine (100 mg/kg, Imalgène 1000, Merial, Lyon, France) and xylazine (10 mg/kg, Rompun 2%, Bayer, Puteau, France). Pupils were dilated with 1% tropicamide (Mydriaticum, Laboratoires Thea, Clermont-Ferrand, France). After 10 min, rats were positioned on a warming plate, and the corneal electrodes were put in place. The ERG was recorded via corneal electrodes (thin gold wire with a 3-mm ring end) and reference and ground electrodes (silver needle) placed on the forehead and tail, respectively. The recording setup featured a Ganzfeld bowl, an amplifier, and a computer-based control and recording unit (RETI port/scan 21, Stasche & Finger GmbH, Roland Consult, Brandenburg, Germany). ERG responses were recorded from both eyes simultaneously after the rats were placed in the Ganzfeld bowl.

The first ERG examination consisted in fixed frequency 8Hz light stimulation ($n=8$ rats per group). Eight-hertz Flicker ERG is a suitable technique to specifically record changes in rod and

cone sensitivity to light stimulus (Seeliger et al., 2001). The responses were recorded at ten increasing intensities from 0.0003 cd.s/m² to 10 cd.s/m² with an inter-stimulus interval of 0.166 s. The second ERG examination corresponded to the scotopic single flash, scotopic threshold response (STR) and oscillatory potential (OP) recordings ($n=8$ rats per group). The band-pass filter width was 1–300 Hz for the recording procedure of scotopic single-flash responses. The stimuli of the scotopic single-flash were recorded with ten increasing intensities from 0.0003 cd.s/m² to 10 cds/m². These responses were averaged with an inter-stimulus interval of 5 s (from 1 to 10 cd.s/m²) or 17 s (up to 0.3 cd.s/m²). The band-pass filter width was 0.2–30 Hz for the STR recording procedure. The STR stimuli were recorded with three increasing intensities: $-4.60 \log$, $-4.32 \log$, and $-4.02 \log$. A 2-s inter-stimulus interval was used between these stimuli. A single stimulus was applied at 0.06 Hz. The inter-stimuli interval was about 17 s. After amplification, the signal was digitized and processed. The amplitude and latency of the a- and b-waves were analyzed as previously described (Bretillon et al., 2008). OPs were recorded as previously published (Fourgeux et al., 2014). The band-pass filter width was 200–500 Hz. A single stimulus was applied at 0.06 Hz. The inter-stimuli interval was about 17 s. After amplification, the signal was digitized and processed on the basis of means of amplitude and time-latency measurements of each of the four typically characterized peaks (OP1–OP4) (Hancock and Kraft, 2004).

2.5 Collection of samples

The animals ($n=8$ rats per group) were fasted overnight. The rats were deeply anesthetized with pentobarbital. Blood was collected from the abdominal artery in EDTA tubes and plasma was prepared by centrifugation (20 min, 3000 rpm) and stored at -80°C until further analysis. Retinas were dissected and stored in RNAlater solution (Qiagen, Courtaboeuf, France) until RNA extraction.

2.6 Plasma analyses

Glycemia was evaluated using a blood glucose system (One Touch Ultra, Lifescan). Cholesterol, triacylglycerol, HDL, LDL, and fructosamine were quantified by standard automatic analyzers (Dimension Vista[®] system, Siemens, Germany) at the Clinical Chemistry Department of the Dijon University Hospital (Dijon, France). Plasma insulin and leptin levels were quantified on a 96-well plate using the Rat Metabolic Magnetic Bead Panel and assessed by Luminex technology

(Biorad Bioplex®200 system, Life Sciences, Marnes-la-Coquette, France). The analyses were performed according to the manufacturers' protocols (Milliplex kit, Merck Millipore).

2.7 Analysis of gene expression in the neurosensory retina

Total RNA from the neurosensory retina ($n=6$ in each group) were extracted using a commercial kit following the manufacturer's procedure (RNAqueous, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).

An aliquot of total RNA (4-5 μ g) was analyzed using Affymetrix Genechips by Plateforme Biopuces et Séquençage, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France. The chips were washed and stained in the GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix) and scanned with the GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) at a resolution of 0.7 μ m. Raw data (CEL Intensity files) were extracted from the scanned images using the Affymetrix GeneChip® Command Console version 3.2 CEL files were further processed with Affymetrix Expression Console software version 1.1 to calculate probe set signal intensities using Robust Multi-array Average algorithms with default settings. To select the differentially expressed genes, we used the fold change rank ordering statistics (FCROS) method (Dembélé and Kastner, 2014). With this method, the samples from two biological conditions were compared. Two independent comparisons were performed: standard diet fed rats at 3 days versus fructose diet fed rats at 3 days, standard diet rats at 8 days versus fructose diet fed rats at 8 days. The FCROS error level was put at 3% for selecting the differentially expressed genes. The lists of genes obtained in the 2 comparison analyses were used as inputs for the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) tool which allows creating gene networks.

Genes with significant FCROS values (≤ 0.03) after Affymetrix GeneChip analysis were further analyzed by RT-qPCR. The list of those 41 selected genes, including 2 control genes (*B2m* and *18S*), is presented in table 2. cDNA was prepared from 4-5 μ g of total RNA using oligo-dT as the primer and the High-Capacity RNA-to-cDNA Master Mix from Applied Biosystems. The quality and concentration of the cDNA samples were checked by qPCR analysis of *B2m* expression using TaqMan technology (ABI7900 Fast Real-Time PCR system, Applied Biosystems). Samples were analyzed using TaqMan Array FAST Custom Plates on Viia7 system, Fast Real-Time PCR system, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France)

2.8 Statistical analyses

All analyses were conducted using GraphPad Prism software version 5.0 (La Jolla, CA, USA). The level of statistical significance was set at $p \leq 0.05$ (*) and 0.01 (†), the tests were two-tailed. A nonparametric Mann & Whitney test was used to compare glycaemia, circulating insulin and leptin levels in the standard and fructose groups. Statistical analysis of Affymetrix Microarrays was performed using FCROS test defining a F value at 0.03 with $\alpha_1=0.015$ and $\alpha_2=0.985$. Analysis of gene expression by qPCR was performed using integrated statistical analysis of data assist software (Student *t*-test). A heat map was performed using the fold change values of qPCR and Microarrays, from downregulation with a 0.1-fold change to up-regulation at a value of 2.2. The levels of statistical significance were set at 0.05 (*), and 0.01 (†) for *t*-test and 0.03 for FCROS.

3. Results

3.1 A short term fructose diet affected plasma parameters

Significant hyperglycemia (+13%), hyperinsulinemia (+83%) and hyperleptinemia (+172%) were observed after 8 days of feeding with high-fructose diet ($p \leq 0.05$), whereas no relevant effect was detected at 3 days (Fig 1). On the other hand, plasma levels of LDL, HDL, cholesterol, triacylglycerol and fructosamine remained unmodified by the high fructose diet (data not shown).

3.2 Fructose diet induced early alterations of sensitivity of photoreceptors

Data demonstrated no effect of fructose on rod or cone sensitivity after 3 days of feeding (Fig 2). On the contrary, data obtained at 8 days of feeding exhibited a shift to the right of the maximal response of cones ($\Delta = 0.5$ log of light stimulus intensity) in rats fed with high fructose diet. This illustrates that a higher light intensity was required to reach the maximal response of cones, suggesting partial loss of cones sensitivity induced by the short term fructose diet.

Oscillatory potentials (OPs) as well as the amplitude and implicit time of a-wave and b-wave were further analyzed but did not present any significant difference in fructose-fed rats compared to rats fed with the standard diet (data not shown).

3.3 Fructose diet modulated the expression of genes in the neurosensory retina

Table 3 summarizes IPA of gene expression changes in the neurosensory retina of rats after 3 and 8 days of a pro-diabetogenic 60%-rich fructose diet. IPA scores revealed that the most significant changes in cell cycle, lipid metabolism were observed at day 3 of fructose feeding. Similarly and expectedly, the pathways of genes coding proteins involved in visual function and development, neurological and ophthalmic diseases were significantly modulated, especially at day 3. Interestingly, genes coding proteins involved in canonical pathways of P70S6kinase and mTOR signaling were regulated, especially after 8 days of fructose feeding, as well as pathways of mitochondrial dysfunction, oxidative stress and eIF2 signaling.

Expression changes of genes identified by Affymetrix Genechips (FCROS values ≤ 0.03) were further confirmed by qPCR. Fold change values obtained by qPCR analysis are presented as a heat map in Figure 3. Among 39 genes which expression was initially identified by Affymetrix Genechip analysis to be modified by fructose feeding at days 3 and 8 (table 2), 19 genes only were confirmed by qPCR at day 3 and 9 at day 8. The following genes coding crystallins were

significantly downregulated in the retina of fructose fed rats after 3 days of feeding, compared with standard fed rats: *Cryab* ($p \leq 0.01$), *Cryba1* and *Cryba2* ($p \leq 0.01$), *Crygc*, *Crygd*, *Cryge* ($p \leq 0.05$), *Crygs* ($p \leq 0.01$). Other genes were similarly regulated: *Nid1* coding Nidogen 1 ($p \leq 0.01$), *Optc* coding Opticin ($p \leq 0.05$), *Pde6H* coding cGMP-specific cone phosphodiesterase 6H ($p \leq 0.05$), *Pla2g1b* coding Phospholipase A2 group 1B ($p \leq 0.01$), *Pitx3* coding Paired-like homeodomain 3 protein ($p \leq 0.01$) and *Slc4a11* coding Solute carrier family 4 sodium borate transporter member 11 ($p \leq 0.01$). Only *Edn2* coding Endothelin 2 was overexpressed at day 3 ($p \leq 0.01$). Three genes were significantly down regulated in the retina after 8 days of fructose feeding: *Bcr* coding Breakpoint cluster region ($p \leq 0.05$), *Fabp5* coding Fatty acid binding protein 5 ($p \leq 0.05$), and *Htra1* coding HtrA serine peptidase 1 ($p \leq 0.01$).

4. Discussion

On the one hand, we showed that a 60% fructose enriched diet induced fast disruptions of plasma levels of glucose, insulin and leptin after only 8 days of feeding suggesting that rat metabolism is very sensitive to a such diabetogenic diet. Accordingly, a recent study showed that rats fed for 7 days with a high fat and high fructose diet (consisting of 10% lard supplemented chow and 20% high-fructose syrup in the drinking water) induced as rapidly obesity and insulin resistance, associated with alterations in the hippocampus: decrease of insulin signaling, hippocampal morphologic, structural, and functional modifications (Calvo-Ochoa et al., 2014).

On the other hand, we reported that the functioning of the neurosensory retina was early affected by these conditions of hyperglycemia, hyperinsulinemia and hyperleptinemia induced by dietary changes. Scotopic single flash electroretinography was performed in order to investigate possible alterations of the functionality of inner retinal cells, but no significant differences were detected. However, the evaluation of sensitivity of photoreceptors using 8Hz Flicker electroretinography (Seeliger et al., 2001) suggested partial loss of cone sensitivity in fructose fed rats at 8 days.

In order to better characterize the retinal changes and try to associate functional alterations to transcriptomic changes, we performed a pan genomic analysis of gene expression in the neurosensory retina using Affymetrix genechips. IPA revealed significant regulation of eIF2 signaling pathway suggesting endoplasmic reticulum stress induced by fructose feeding at both 3 and 8 days of the diet. Consistent with the expected biological effects of fructose in the

generation of oxidative stress (Delbosc et al., 2005), pathways involved in mitochondrial functions and oxidative stress were modulated.

Among the genes which expression changes were identified by microarray analysis, we confirmed down regulation of numerous crystallin gene subfamilies after 3 days of diet. Crystallins constitute a family of proteins containing similar structural domains. Initially characterized in the lens where they play a critical role in maintaining its transparency, they were discovered outside the vertebrate eye lens by Bhat and Nagineni in 1989 who found α B-crystallin expression in the retina, heart, skeletal muscles, skin, and brain among other tissues (Bhat and Nagineni, 1989). Recent findings pointed out their anti-inflammatory and anti-apoptotic functions in the retina in normal and disease conditions (Kannan et al., 2012). α A-crystallin and α B-crystallin are considered as small heat shock proteins and are constitutively expressed during development. Though chaperone activity was the first described function of α -crystallins in the eye, the importance of α -crystallins in cellular function is further highlighted by their participation in a growing number of fundamental cellular processes, such as prevention of apoptosis, protection against oxidant insults, and neuroprotection (Andley, 2007; Arrigo et al., 2007). More recently α -crystallins were thought to participate to retinal neuron survival while β/γ could be involved in axonal regeneration (Thanos et al., 2014).

By using both microarray and qPCR analyses, we reported down regulation of genes coding α -, β - and γ - crystallins. This finding is in contradiction with previous studies that described that α - and β - crystallins were upregulated in rodent models of type 1 and type 2 diabetes (Kim et al., 2007; Fort et al., 2009; Losiewicz and Fort, 2011; Heise et al., 2013). Up regulation of α A-crystallin in DR was supposed to respond to AGE accumulation, which may contribute to the protection of photoreceptors against AGE-related retinal tissue injury (Kase et al., 2011). Another report suggested that β -crystallins could be involved in different aspects of the pathogenesis of DR and particularly in the regulation of retinal vascular remodeling (Sinha et al., 2008).

Downregulation of *Crygc*, *Crygd*, *Cryge*, and *Crygs* was also presented in our study. Immunohistochemistry showed that γ - crystallin expression was concentrated in astrocytes surrounding vasculature of the retained hyaloid artery; its involvement in vascular remodeling via VEGF interaction was also suggested (Zhang et al., 2005). Upregulation of γ - crystallins was reported in axons of retinal ganglion cells in diabetes (Fort et al., 2009).

α -Crystallins have been implicated in the regulation of inflammation and cell survival (Masilamoni et al., 2005; Losiewicz and Fort, 2011). It has been suggested that an increase of α -crystallin could reflect an adaptive counteractive response of the tissue to the induction of pro apoptotic mechanisms and particularly during transient stress episodes, although α -crystallin were not able to completely prevent retinal cell death associated with chronic stress in type 1 diabetic rats (Heise et al., 2013).

One of the reasons for this discrepancy between our results showing down regulation of genes coding α , β and γ -crystallins and previous ones may be that we focused on very early steps of the adaptation of the retina, i.e. 3 and 8 days when compared to 4 (Heise et al., 2013) or 12 weeks (Losiewicz and Fort, 2011; Heise et al., 2013). We hypothesized that down regulation of crystallin genes could be a pre-adaptive response of the retina to a pro-diabetogenic environment triggered by high-fructose feeding. A similar mechanism may be suggested with *Npy* since we reported its down regulation at day 3, whereas the opposite was observed after 9 months of feeding with high fructose in the hypothalamus (Bursac et al., 2014). Accounting that neither glycaemia, nor insulinemia nor leptinemia were modified at day 3 of the feeding experiment while down regulation of crystallins and *Npy* was at its highest level of magnitude, we postulate that those gene expression changes may more likely be the early response to the changes in dietary intakes than to adaptive mechanisms taking place in the retina during diabetes. Further analysis of crystallin gene expression in the retina would be warranted at later time points of feeding with high fructose. It must be noticed that, although down regulation was still significant at day 8, fold change of crystallin expression tended to normalize at this time point.

Secondly, the models are different: streptozotocin-induced diabetes (Losiewicz and Fort, 2011; Heise et al., 2013) compared to fructose-feeding. Nevertheless, we must point out that feeding rats with high fructose is a recognized model for inducing insulin resistance (Aydin et al., 2014). We recently published data showing hyperinsulinemia, hyperleptinemia, liver steatosis and body adiposity after 1 and 3 months of high fructose feeding (Thierry et al., 2014). In this study we also reported increased laser-induced choroidal neovascularization (CNV) in rats fed with high fructose, when compared to rats fed with a standard diet, suggesting that insulin resistance would be a favorable environment for the development of CNV.

Nid1 gene was down regulated at day 3. Interestingly a recent study described that *Nid1* was a member of the crystallin gene network in the retina (Templeton et al., 2013). To some extent, down regulation of *Nid1* would be consistently associated to down regulation of crystallin genes. *Nid1* is coding for Nidogen 1 that is a protein localized in the inner limiting membrane of the retina (Balasubramani et al., 2010; Semkova et al., 2014). Reduced expression of *Nid1* gene in inner limiting membrane and Bruch's membrane was reported in leptin-receptor deficient *db/db* mice (Abari et al., 2013). Interestingly, *Nid1* knock-out showed increased laser-induced CNV compared to wild type animals (Semkova et al., 2014). *Optc* gene was similarly down regulated at day 3. *Optc* is coding for Opticin protein that is specifically localized in the inner retina (Keenan et al., 2012). The lack of Opticin was involved in the formation of pre-CNV lesions in the retina (Le Goff et al., 2012). Altogether, changes in *Optc* and *Nid1* gene expression may be consistent with our data showing increased propensity of rats fed with high-fructose to develop laser-induced CNV (Thierry et al., 2014).

Edn2 gene was found to be up regulated at day 3 of the experiment. *Edn2* is coding Endothelin 2 protein that was reported to be a stress signal of photoreceptor stress for glial Müller cells in the retina (Rattner and Nathans, 2005), and one of the members of the survival pathways of photoreceptors (Samardzija et al., 2012). Up regulation of *Edn2* gene at day 3 may therefore reflect early stress of photoreceptors in response to high fructose feeding that would be functionally observed at day 8 by partial loss of cone sensitivity.

In summary, our data are consistent for an early alteration of plasma parameters and functionality of the retina after only few days of fructose feeding in rats. These finding may provide evidence for the development of functional deficits of the retina as early events of insulin resistance. Crystallins, opticin, NPY, nidogen 1 may be in the adaptation of the retina to this new environment, and potentially to the development of retinopathies, and associated neovascular complications.

5. Acknowledgments

We thank Prof. Laurence Duvillard (Department of Clinical Chemistry, Dijon University Hospital, Dijon, France) for providing access to the analytical platform, Serge Monier (Dijon University Hospital, Dijon, France) for helping us analyze plasma samples with flow cytometry. We are grateful to Dr. Gérard Lizard (University of Burgundy, Dijon, France) and Dr. Corinne Joffre (INRA and University of Bordeaux, Bordeaux, France) for participating in the scientific advisory board of MT's fellowship.

6. Grants

This work was supported by grants from Laboratoires Horus Pharma (Saint Laurent du Var, France), the Regional Council of Burgundy France (PARI Agrale 1), the FEDER (European Funding for Regional Economic Development), INRA, CNRS, Université de Bourgogne, and by a French Government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the “Investissements d’Avenir” program with reference ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC Labex. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

7. Figure legends and captions

Figure 1: Evaluation of glycaemia (a), insulinemia (b) and leptinemia (c) in fructose fed rats after 3 and 8 days of feeding.

Values are given as means \pm SD ($n=8$ rats per group). * and † statistically different at $p \leq 0.05$ and 0.01, respectively (Mann & Whitney test).

Figure 2: 8Hz Flicker electroretinographic data of the rats fed with either the standard (black traces) or 60%-rich fructose (red traces) diet during 3 or 8 days.

Data of the amplitude of the electroretinographic response (in % of the maximum amplitude) are plotted as a function of light stimulus intensity (log (I)) ($n=8$ per group). The first peak corresponds to the maximal response of rods and the second peak to the maximal response of cones (Seeliger et al., 2001). A shift to the right of the second peak in the 60%-rich fructose fed rats is indicative of the loss of rod sensitivity in fructose-fed animals.

Figure 3: Heat map representation of gene expression changes obtained by RT-qPCR analysis of the neurosensory retina of rats fed 3 and 8 days with a 60%-rich fructose diet compared to rats fed with a standard chow diet.

Fold change is indicated in the color scale, green color indicates maximum downregulation (fold change=0.1) and red color indicates maximum upregulation (fold change=2.2). * and †, significant gene expression effect at $p \leq 0.05$ and 0.01, respectively ($n=6$ per group, Student *t*-test).

8. References

- Abari, E., Kociok, N., Hartmann, U., Semkova, I., Paulsson, M., Lo, A., Jousen, A.M., 2013. Alterations in basement membrane immunoreactivity of the diabetic retina in three diabetic mouse models. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 251, 763–775. doi:10.1007/s00417-012-2237-8
- Abcouwer, S.F., Gardner, T.W., 2014. Diabetic retinopathy: loss of neuroretinal adaptation to the diabetic metabolic environment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1311, 174–190. doi:10.1111/nyas.12412
- Alberti, K.G.M.M., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J.-C., James, W.P.T., Loria, C.M., Smith, S.C., Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120, 1640–1645. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644
- Andley, U.P., 2007. Crystallins in the eye: Function and pathology. *Prog. Retin. Eye Res.* 26, 78–98. doi:10.1016/j.preteyeres.2006.10.003
- Antonetti, D.A., Barber, A.J., Bronson, S.K., Freeman, W.M., Gardner, T.W., Jefferson, L.S., Kester, M., Kimball, S.R., Krady, J.K., LaNoue, K.F., Norbury, C.C., Quinn, P.G., Sandrasegarane, L., Simpson, I.A., 2006. Diabetic Retinopathy Seeing Beyond Glucose-Induced Microvascular Disease. *Diabetes* 55, 2401–2411. doi:10.2337/db05-1635
- Arrigo, A.-P., Simon, S., Gibert, B., Kretz-Remy, C., Nivon, M., Czekalla, A., Guillet, D., Moulin, M., Diaz-Latoud, C., Vicart, P., 2007. Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Lett.* 581, 3665–3674. doi:10.1016/j.febslet.2007.04.033
- Aydin, S., Aksoy, A., Aydin, S., Kalayci, M., Yilmaz, M., Kuloglu, T., Cital, C., Catak, Z., 2014. Today's and yesterday's of pathophysiology: biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition* 30, 1–9. doi:10.1016/j.nut.2013.05.013
- Balasubramani, M., Schreiber, E.M., Candiello, J., Balasubramani, G.K., Kurtz, J., Halfter, W., 2010. Molecular interactions in the retinal basement membrane system: a proteomic approach. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 29, 471–483. doi:10.1016/j.matbio.2010.04.002
- Benani, A., Hryhorczuk, C., Gouazé, A., Fioramonti, X., Brenachot, X., Guissard, C., Krezymon, A., Duparc, T., Colom, A., Nédélec, E., Rigault, C., Lemoine, A., Gascuel, J., Gerardy-Schahn, R., Valet, P., Knauf, C., Lorsignol, A., Pénicaud, L., 2012. Food intake adaptation to dietary fat involves PSA-dependent rewiring of the arcuate melanocortin system in mice. *J. Neurosci.* 32, 11970–11979. doi:10.1523/JNEUROSCI.0624-12.2012
- Bhat, S.P., Nagineni, C.N., 1989. α B subunit of lens-specific protein α -crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158, 319–325. doi:10.1016/S0006-291X(89)80215-3

- Bretillon, L., Acar, N., Seeliger, M.W., Santos, M., Maire, M.A., Juanéda, P., Martine, L., Grégoire, S., Joffre, C., Bron, A.M., Creuzot-Garcher, C., 2008. ApoB100,LDLR-/- mice exhibit reduced electroretinographic response and cholesteryl esters deposits in the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 1307–1314. doi:10.1167/iovs.07-0808
- Bursać, B.N., Vasiljević, A.D., Nestorović, N.M., Veličković, N.A., Vojnović Milutinović, D.D., Matić, G.M., Djordjevic, A.D., 2014. High-fructose diet leads to visceral adiposity and hypothalamic leptin resistance in male rats--do glucocorticoids play a role? *J. Nutr. Biochem.* 25, 446–455. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.12.005
- Calvo-Ochoa, E., Hernández-Ortega, K., Ferrera, P., Morimoto, S., Arias, C., 2014. Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 1001–1008. doi:10.1038/jcbfm.2014.48
- Darwin, C. (1859). On the origin of species by means of natural selection, *Murray, London*.
- Dekker, M.J., Su, Q., Baker, C., Rutledge, A.C., Adeli, K., 2010. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299, E685–694. doi:10.1152/ajpendo.00283.2010
- Delbosc, S., Paizanis, E., Magous, R., Araiz, C., Dimo, T., Cristol, J.-P., Cros, G., Azay, J., 2005. Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis* 179, 43–49. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.10.018
- Dembélé, D., Kastner, P., 2014. Fold change rank ordering statistics: a new method for detecting differentially expressed genes. *BMC Bioinformatics* 15, 14. doi:10.1186/1471-2105-15-14
- Fort, P.E., Freeman, W.M., Losiewicz, M.K., Singh, R.S.J., Gardner, T.W., 2009. The retinal proteome in experimental diabetic retinopathy: up-regulation of crystallins and reversal by systemic and periocular insulin. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 767–779. doi:10.1074/mcp.M800326-MCP200
- Fourgeux, C., Martine, L., Acar, N., Bron, A.M., Creuzot-Garcher, C.P., Bretillon, L., 2014. In vivo consequences of cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) inhibition by voriconazole on cholesterol homeostasis and function in the rat retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 775–781. doi:10.1016/j.bbrc.2014.01.118
- Hancock, H.A., Kraft, T.W., 2004. Oscillatory potential analysis and ERGs of normal and diabetic rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 1002–1008.
- Heise, E.A., Marozas, L.M., Grafton, S.A., Green, K.M., Kirwin, S.J., Fort, P.E., 2013. Strain-independent increases of crystallin proteins in the retina of type 1 diabetic rats. *PloS One* 8, e82520. doi:10.1371/journal.pone.0082520
- Jaissle, G.B., May, C.A., Reinhard, J., Kohler, K., Fauser, S., Lütjen-Drecoll, E., Zrenner, E., Seeliger, M.W., 2001. Evaluation of the rhodopsin knockout mouse as a model of pure cone function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 506–513.

- Kannan, R., Sreekumar, P.G., Hinton, D.R., 2012. Novel roles for α -crystallins in retinal function and disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 31, 576–604. doi:10.1016/j.preteyeres.2012.06.001
- Kase, S., Ishida, S., Rao, N.A., 2011. Increased expression of α A-crystallin in human diabetic eye. *Int. J. Mol. Med.* 28, 505–511. doi:10.3892/ijmm.2011.708
- Keenan, T.D.L., Clark, S.J., Unwin, R.D., Ridge, L.A., Day, A.J., Bishop, P.N., 2012. Mapping the differential distribution of proteoglycan core proteins in the adult human retina, choroid, and sclera. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 7528–7538. doi:10.1167/iovs.12-10797
- Kim, Y.H., Choi, M.Y., Kim, Y.S., Han, J.M., Lee, J.H., Park, C.H., Kang, S.S., Choi, W.S., Cho, G.J., 2007. Protein kinase C delta regulates anti-apoptotic α B-crystallin in the retina of type 2 diabetes. *Neurobiol. Dis.* 28, 293–303. doi:10.1016/j.nbd.2007.07.017
- Le Goff, M.M., Lu, H., Ugarte, M., Henry, S., Takanosu, M., Mayne, R., Bishop, P.N., 2012. The vitreous glycoprotein opticin inhibits preretinal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 228–234. doi:10.1167/iovs.11-8514
- Losiewicz, M.K., Fort, P.E., 2011. Diabetes impairs the neuroprotective properties of retinal α -crystallins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 5034–5042. doi:10.1167/iovs.10-6931
- Masilamoni, J.G., Jesudason, E.P., Bharathi, S.N., Jayakumar, R., 2005. The protective effect of α -crystallin against acute inflammation in mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1740, 411–420. doi:10.1016/j.bbadis.2004.11.002
- Rattner, A., Nathans, J., 2005. The genomic response to retinal disease and injury: evidence for endothelin signaling from photoreceptors to glia. *J. Neurosci.* 25, 4540–4549. doi:10.1523/JNEUROSCI.0492-05.2005
- Samardzija, M., Wariwoda, H., Imsand, C., Huber, P., Heynen, S.R., Gubler, A., Grimm, C., 2012. Activation of survival pathways in the degenerating retina of rd10 mice. *Exp. Eye Res.* 99, 17–26. doi:10.1016/j.exer.2012.04.004
- Seeliger, M.W., Grimm, C., Ståhlberg, F., Friedburg, C., Jaissle, G., Zrenner, E., Remé, C.E., Guo, H., Humphries, P., Hofmann, F., Biel, M., Fariss, R.N., Redmond, T.M., Wenzel, A., 2001. New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Nat. Genet.* 29, 70–74. doi:10.1038/ng712
- Semkova, I., Kociok, N., Karagiannis, D., Nischt, R., Smyth, N., Paulsson, M., Strauß, O., Joussen, A.M., 2014. Anti-angiogenic effect of the basement membrane protein nidogen-1 in a mouse model of choroidal neovascularization. *Exp. Eye Res.* 118, 80–88. doi:10.1016/j.exer.2013.11.006
- Sinha, D., Klise, A., Sergeev, Y., Hose, S., Bhutto, I.A., Hackler, L., Malpic-Llanos, T., Samtani, S., Grebe, R., Goldberg, M.F., Hejtmancik, J.F., Nath, A., Zack, D.J., Fariss, R.N., McLeod, D.S., Sundin, O., Broman, K.W., Luttý, G.A., Zigler, J.S., 2008. β A3/A1-crystallin in astroglial cells regulates retinal vascular remodeling during development. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 85–95. doi:10.1016/j.mcn.2007.08.016

- Templeton, J.P., Wang, X., Freeman, N.E., Ma, Z., Lu, A., Hejtmancik, F., Geisert, E.E., 2013. A crystallin gene network in the mouse retina. *Exp. Eye Res.* 116, 129–140. doi:10.1016/j.exer.2013.08.001
- Thanos, S., Böhm, M.R.R., Meyer Zu Hörste, M., Prokosch-Willing, V., Hennig, M., Bauer, D., Heiligenhaus, A., 2014. Role of crystallins in ocular neuroprotection and axonal regeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 42C, 145–161. doi:10.1016/j.preteyeres.2014.06.004
- Thierry, M., Pasquis, B., Acar, N., Gregoire, S., Febvret, V., Buteau, B., Gambert-Nicot, S., Bron, A.M., Creuzot-Garcher, C.P., Bretillon, L., 2014. Metabolic syndrome triggered by high fructose diet favors choroidal neovascularization and impaired retinal light sensitivity in the rat. *PloS ONE*. Accepted.
- Verginelli, F., Aru, F., Battista, P., Mariani-Costantini, R., 2009. Nutrigenetics in the Light of Human Evolution. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics.* 2, 91–102. doi:10.1159/000228251
- Zhang, C., Gehlbach, P., Gongora, C., Cano, M., Fariss, R., Hose, S., Nath, A., Green, W.R., Goldberg, M.F., Zigler, J.S., Sinha, D., 2005. A potential role for beta- and gamma-crystallins in the vascular remodeling of the eye. *Dev. Dyn.* 234, 36–47. doi:10.1002/dvdy.20494

Table 1: Composition of the experimental diets

	Standard diet	Fructose diet
	In g per kg of diet	
Casein	180	180
Cornstarch	460	90
Sucrose	230	0
Fructose	0	600
Cellulose	20	20
Mineral mix ^a	50	50
Vitamin mix ^b	10	10
Fat ^c	50	50

^a Composition (g/kg): sucrose, 110.7; CaCO₃, 240; K₂HPO₄, 215; CaHPO₄, 215; MgSO₄·7H₂O, 100; NaCl, 60; MgO, 40; FeSO₄·7H₂O, 8; ZnSO₄·7H₂O, 7; MnSO₄·H₂O, 2; CuSO₄·5H₂O, 1; Na₂SiO₇·3H₂O, 0.5; AlK(SO₄)₂·12H₂O, 0.2; K₂CrO₄, 0.15; NaF, 0.1; NiSO₄·6H₂O, 0.1; H₂BO₃, 0.1; CoSO₄·7H₂O, 0.05; KIO₃, 0.04; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0.02; LiCl, 0.015; Na₂SeO₃, 0.015; NH₄VO₃, 0.01.

^b Composition (g/kg): sucrose, 549.45; retinyl acetate, 1; cholecalciferol, 0.25; DL-tocopheryl acetate, 20; phylloquinone, 0.1; thiamine HCl, 1; riboflavin, 1; nicotinic acid, 5; calcium pantothenate, 2.5; pyridoxine HCl, 1; biotin, 1; folic acid, 0.2; cyanocobalamin, 2.5; choline HCl, 200; DL-methionine, 200; p-aminobenzoic acid, 5; inositol, 10.

^c Composition of the oil mix (%): rapeseed oil, 18.7; oleic oil, 38.1; sunflower oil, 5; palm oil, 38.1. Omega 6 to omega 3 ratio=7.5.

Table 2: Genes which expression in the neurosensory retina was significantly modulated after 3 and 8 days of fructose feeding in rats, as revealed by Affimetrix gene chip analysis

Gene symbol	Gene name	Reference sequence
<i>18S</i> (control)	Ribosomal 18S sub-unit	X_03205
<i>B2m</i> (control)	beta-2 microglobulin	NM_012512
<i>Akt1</i>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog	NM_033230.1
<i>Aqp4</i>	aquaporin 4	NM_001142366
<i>Bcr</i>	breakpoint cluster region	XM_228091
<i>Casp3</i>	caspase 3	NM_012922
<i>Casp7</i>	caspase 7	NM_022260
<i>Crabp2</i>	cellular retinoic acid binding protein 2	NM_017244
<i>Cryab</i>	crystallin, alpha B	NM_012935
<i>Cryba1</i>	crystallin, beta A1	XM_340846
<i>Cryba2</i>	crystallin, beta A2	NM_173140
<i>Crygc</i>	crystallin, gamma C	NM_001081660
<i>Crygd</i>	crystallin, gamma D	NM_033095
<i>Cryge</i>	crystallin, gamma E	NM_173289
<i>Crygs</i>	crystallin, gamma S	NM_001109553
<i>Edn2</i>	endothelin 2	NM_012549
<i>Fabp5</i>	fatty acid binding protein 5	NM_145878
<i>Fgf2</i>	fibroblast growth factor 2	NM_019305
<i>Fscn2</i>	fascin homolog 2, actin-bundling protein, retinal	NM_001107072
<i>Htr1f</i>	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1F	NM_021857

<i>Htra1</i>	HtrA serine peptidase 1	NM_031721
<i>Igf1</i>	insulin-like growth factor 1	NM_001082477
<i>Igf2</i>	insulin-like growth factor 2	NM_001190162
<i>Mme</i>	membrane metallo-endopeptidase	NM_012608
<i>Ncam2</i>	neural cell adhesion molecule 2	NM_203409
<i>Nid1</i>	nidogen 1	XM_213954
<i>Npy</i>	neuropeptide Y	NM_012614
<i>Nsg1</i>	neuron specific gene family member 1	NM_024128
<i>Optc</i>	opticin	NM_001107176
<i>Pde6h</i>	phosphodiesterase 6H, cGMP-specific, cone, gamma	NM_053688
<i>Pik3r1</i>	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)	NM_013005
<i>Pitx3</i>	paired-like homeodomain 3	NM_019247
<i>Pla2g1b</i>	phospholipase A2, group IB	NM_031585
<i>Plcb1</i>	phospholipase C, beta 1	NM_001077641
<i>Psmc9</i>	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 9	NM_130430
<i>Rbp1</i>	retinol binding protein 1, cellular	NM_012733
<i>Rpe65</i>	retinal pigment epithelium 65	NM_053562
<i>Slc4a11</i>	solute carrier family 4, sodium borate transporter, member 11	NM_001107775
<i>Spata7</i>	spermatogenesis associated 7	NM_138862
<i>Tank</i>	TRAF family member-associated NFkB activator	NM_001164073
<i>Tp53</i>	tumor protein p53	NM_030989

Table 3: IPA analysis of gene pathways significantly modulated in the neurosensory retina of rats fed during 3 and 8 days with high fructose diet

	Feeding period			
	3 days		8 days	
	IPA score ^a	nr of genes	IPA score ^a	nr of genes
Molecular and cellular functions				
Cell cycle	1.67 – 4.08	25	1.70 – 3.52	26
Cell death and survival	1.70 – 3.03	52	1.70 – 4.11	102
Cellular compromise	1.70 – 2.28	12	1.70 – 3.78	20
Cellular function and maintenance	1.70 – 3.40	25	1.70 – 3.78	57
DNA replication, recombination and repair	1.70 – 3.37	23	1.70 – 4.11	12
Protein synthesis	1.67 – 3.58	37	1.73 – 5.98	58
Lipid metabolism	1.70 – 3.96	21	1.70 – 2.22	11
Molecular transport	1.67 – 3.96	27	1.70 – 2.93	56
Physiological system development and functions				
Embryonic development	1.71 – 6.47	31	1.70 – 3.40	20
Organ development	1.71 – 6.47	32	1.70 – 2.15	14
Organismal development	1.67 – 6.47	36	1.70	2
Tissue development	1.67 – 6.47	39	1.70 – 2.93	36
Visual system development and function	1.67 – 6.47	28	1.70 – 2.11	3
Diseases and disorders				
Developmental disorders	1.82 – 10.23	34	1.70 – 3.40	32
Ophthalmic diseases	1.82 – 10.2	27	1.70	2
Neurological diseases	1.70 – 7.66	80	1.70 – 8.21	63
Psychological disorders	1.74 – 7.66	62	1.70 – 6.38	44
Hereditary disorders	1.70 – 6.74	72	1.70 – 5.27	65
Canonical pathways – Top toxicological pathways				
eIF2 signaling	6.20	14/192 ^b	11.66	23/192 ^b
Mitochondrial dysfunction	3.24	9/157 ^b	2.90	10/157 ^b
Endoplasmic reticulum stress	1.54	2/18 ^b	2.29	2/18 ^b
Oxidative stress	2.80	5/57 ^b	<1.52	0/57 ^b

Regulation of eIF4 and p70S6K signaling	2.79	8/164 ^b	3.11	10/164 ^b
mTOR signaling	2.12	8/198 ^b	2.30	10/198 ^b

^a IPA enrichment score=-log (P-value).

^b Ratio of genes represented in the gene list versus total genes in the pathway (IPA was carried out on August 26th, 2014)

Figure 1

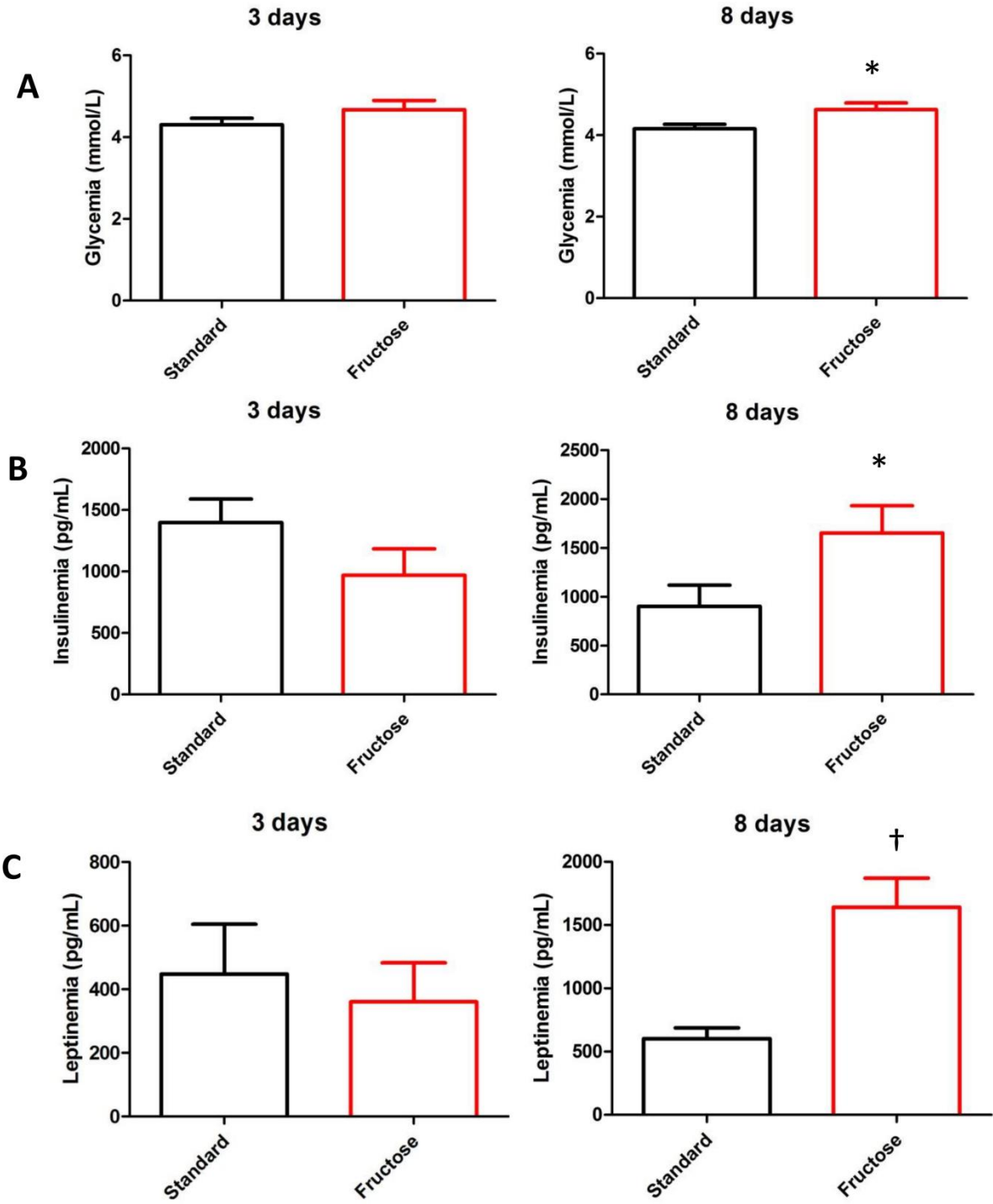


Figure 2

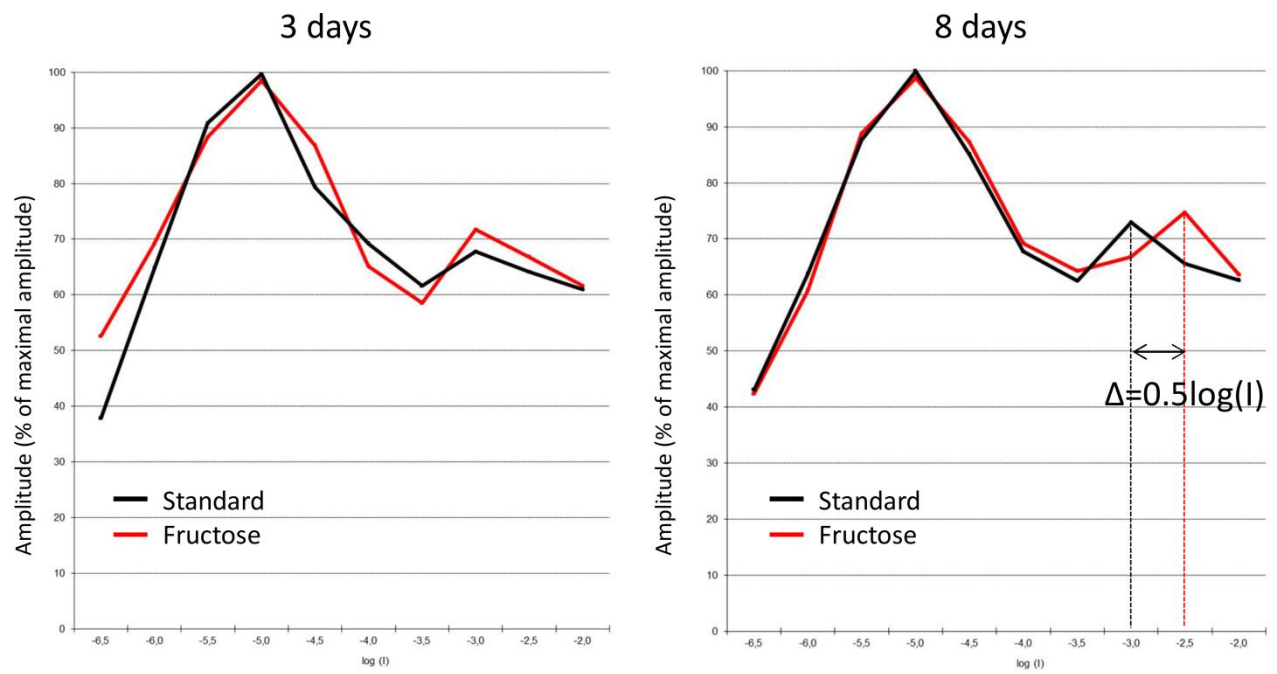
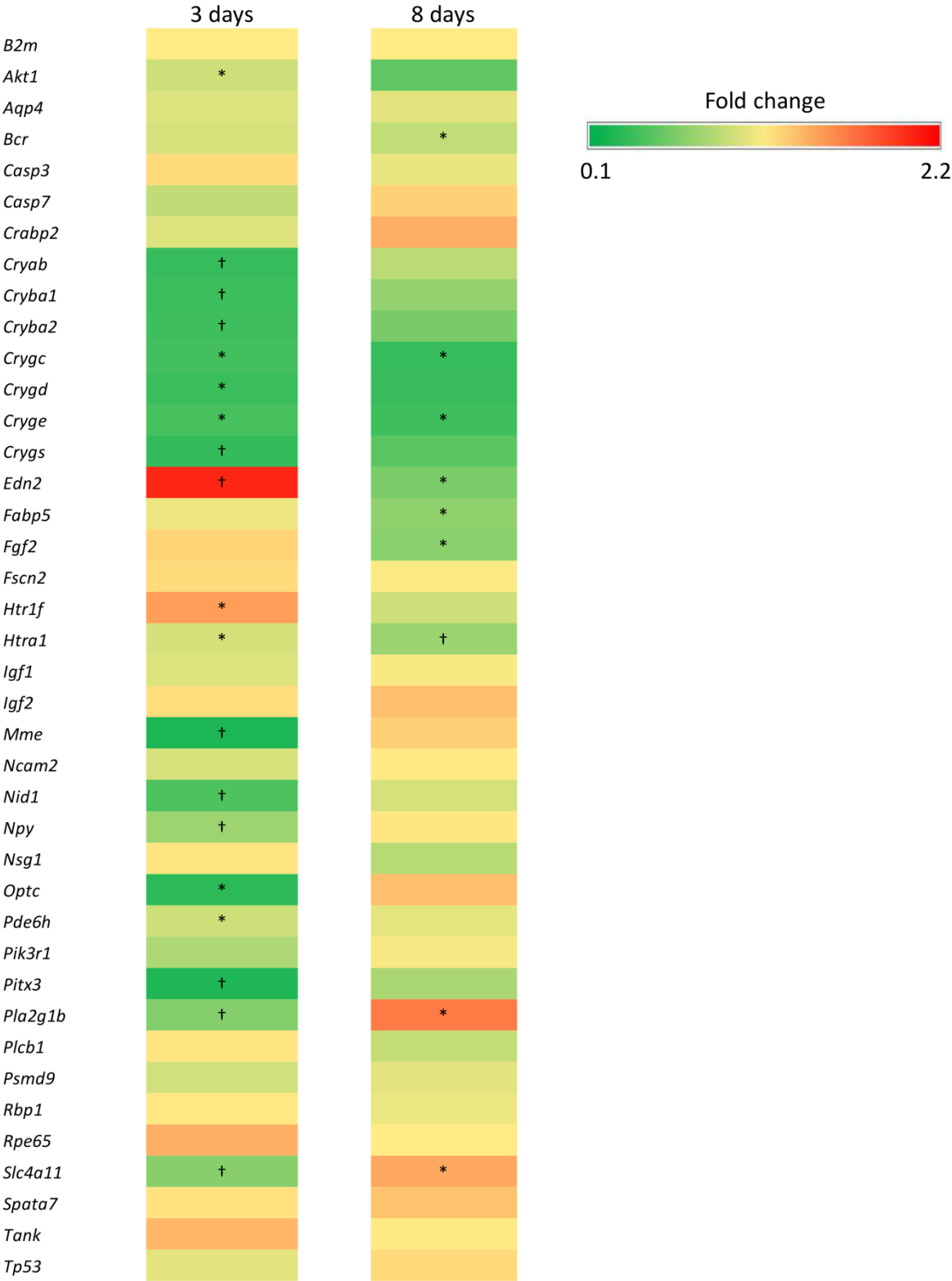


Figure 3



III-Résultats et conclusions principales

Des rats Brown Norway ont été soumis pendant respectivement 3 jours et 8 jours à un régime enrichi à 60% de fructose et comparés à des rats soumis à un régime standard. Après 8 jours de régime enrichi en fructose, les animaux développent une hyperglycémie, une hyperinsulinémie et une hyperleptinémie significatives justifiant d'une affectation très rapide de leur métabolisme face à cet environnement diabétogène.

Les analyses électrorétinographiques menées en conditions scotopiques simple flash n'ont pas montré d'altérations fonctionnelles significatives des cellules de la rétine interne. En revanche, l'étude de la sensibilité des photorécepteurs par ERG de type Flicker à 8Hz a révélé une diminution de la sensibilité des photorécepteurs de type cônes après seulement 8 jours de régime. Ce type d'altération a également été retrouvé dans le cadre d'un diabète avec RD ou non (Yamamoto et al., 1996) ou chez des rats rendus diabétiques par streptozotocine suggérant une dégénération des cônes S et M (Énzöly et al., 2014).

Dans le but de comprendre quels mécanismes pouvaient être l'origine d'une atteinte aussi précoce, un ciblage de l'expression des gènes dans la rétine a été réalisé par biopuces Affymetrix. Ces analyses confirmées ensuite par RT-qPCR ont particulièrement mis en évidence, dès 3 jours de régime, une sous expression des sous familles de cristallines : *Cryab*, *Cryba1*, *Cryba2*, *Crygc*, *Crygd*, *Cryge*, *Crygs*. Ces données conformément à d'autres études dans ce domaine (Heise et al., 2013) (Losiewicz and Fort, 2011) (Fort et al., 2009) (Sinha et al., 2008) (Kim et al., 2007) confirmeraient l'implication des cristallines dans la pathogénèse du diabète. À ce stade précoce, elles pourraient constituer une réponse adaptative de la rétine face à un nouvel environnement. Ceci suggérerait une implication potentielle des cristallines dans les prémices de l'apparition des pathologies oculaires telle que la rétinopathie diabétique. Par ailleurs, cette étude a montré également une sous expression de *Nid1*, un gène qui serait en relation avec le réseau des cristallines, et dont la protéine a récemment été identifiée comme disposant d'effets anti-angiogéniques (Semkova et al., 2014).

Cette étude met finalement en exergue la présence d'altérations précoces dans la rétine et l'existence de modifications de l'expression génique après seulement quelques jours de régime diabétogène. Ces données confirment l'existence de dysfonctions des cellules rétiniennes dès les premiers stades d'installation d'un SMet, bien avant qu'une

insulinorésistance ou qu'un diabète ne soient installés ou que des complications microvasculaires ne soient détectées.

Il nous a paru à ce stade intéressant de considérer des durées de régime à plus long terme afin de déterminer si d'une part ces altérations étaient seulement transitoires. D'autre part, nous souhaitons identifier si un tel régime était susceptible de constituer un environnement favorisant l'apparition de complications néovasculaires et d'autres altérations fonctionnelles dans la rétine. Ceci nous permettrait alors de décrire un nouveau modèle pour l'étude des pathologies réiniennes.

Chapitre 3

Caractérisation de l'adaptation de la rétine à un régime diabétogène à long terme

I-Problématique

La RD et la DMLA représentent les principales causes de déficience et de perte de la vision dans les populations occidentales avant l'âge de 50 ans (Klein and Klein, 2013). L'association entre ces deux pathologies oculaires restent cependant très controversée, bien que de nombreuses études aient rapporté une augmentation de la prévalence de la DMLA chez les patients atteints de diabète ou de RD (Clemons et al., 2005) (Hahn et al., 2013) (Klein and Klein, 2013) (Mitchell and Wang, 1999) (Topouzis et al., 2009). D'autre part, à ce jour peu de données sont connues sur l'adaptation et la caractérisation de la rétine dans le cadre d'un syndrome métabolique.

Nous avons émis ici l'hypothèse qu'un syndrome métabolique, facteur de risque majeur d'un diabète de type 2 serait susceptible de constituer un environnement favorable au développement d'une néovascularisation choroïdienne, une complication majeure de la DMLA.

Dans ce but, des rats Brown Norway ont été soumis à un régime diabétogène enrichi en fructose à long terme (1, 3 et 6 mois) afin d'induire une insulino-résistance et ont été comparés à des rats soumis à un régime standard. Ces animaux ont été d'une part soumis à des électrorétinographies afin d'évaluer d'éventuelles altérations des fonctionnalités de la rétine. Ils ont reçu d'autre part des impacts laser au niveau de la membrane de Bruch afin de créer une néovascularisation choroïdienne. Cette étude a donc pour but d'identifier si un régime diabétogène serait susceptible de favoriser l'apparition d'altérations et de créer un environnement favorable à des complications de type néovasculaires dans la rétine.

Les résultats de cette étude font l'objet d'une publication acceptée dans le journal PLoS ONE.



Metabolic Syndrome Triggered by High-Fructose Diet Favors Choroidal Neovascularization and Impairs Retinal Light Sensitivity in the Rat

Magalie Thierry^{1,2,3}, Bruno Pasquis^{1,2,3}, Niyazi Acar^{1,2,3}, Stéphane Grégoire^{1,2,3}, Valérie Febvret^{1,2,3}, Bénédicte Buteau^{1,2,3}, Ségolène Gambert-Nicot^{1,2,3,4}, Alain M. Bron^{1,2,3,5}, Catherine P. Creuzot-Garcher^{1,2,3,5}, Lionel Bretilon^{1,2,3*}

1 INRA, UMR 1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Eye and Nutrition Research Group, Dijon, France, **2** CNRS, UMR 6265 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Dijon, France, **3** Université de Bourgogne, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Dijon, France, **4** Department of Clinical Chemistry, University Hospital, Dijon, France, **5** Department of Ophthalmology, University Hospital, Dijon, France

Abstract

Diabetic retinopathy and age-related macular degeneration are the leading causes of blindness in Western populations. Although it is a matter of controversy, large-scale population-based studies have reported increased prevalence of age-related macular degeneration in patients with diabetes or diabetic retinopathy. We hypothesized that metabolic syndrome, one of the major risk factors for type 2 diabetes, would represent a favorable environment for the development of choroidal neovascularization, the main complication of age-related macular degeneration. The fructose-fed rat was used as a model for metabolic syndrome in which choroidal neovascularization was induced by laser photocoagulation. Male Brown Norway rats were fed for 1, 3, and 6 months with a standard equilibrated chow diet or a 60%-rich fructose diet ($n=24$ per time point). The animals expectedly developed significant body adiposity (+17%), liver steatosis at 3 and 6 months, hyperleptinemia at 1 and 3 months (two-fold increase) and hyperinsulinemia at 3 and 6 months (up to two-fold increase), but remained normoglycemic and normolipemic. The fructose-fed animals exhibited partial loss of rod sensitivity to light stimulus and reduced amplitude of oscillatory potentials at 6 months. Fructose-fed rats developed significantly more choroidal neovascularization at 14 and 21 days post-laser photocoagulation after 1 and 3 months of diet compared to animals fed the control diet. These results were consistent with infiltration/activation of phagocytic cells and up-regulation of pro-angiogenic gene expression such as *Vegf* and *Leptin* in the retina. Our data therefore suggested that metabolic syndrome would exacerbate the development of choroidal neovascularization in our experimental model.

Citation: Thierry M, Pasquis B, Acar N, Grégoire S, Febvret V, et al. (2014) Metabolic Syndrome Triggered by High-Fructose Diet Favors Choroidal Neovascularization and Impairs Retinal Light Sensitivity in the Rat. PLoS ONE 9(11): e112450. doi:10.1371/journal.pone.0112450

Editor: Torben Lykke Sørensen, Copenhagen University Hospital Roskilde and the University of Copenhagen, Denmark

Received: July 26, 2014; **Accepted:** October 7, 2014; **Published:** November 7, 2014

Copyright: © 2014 Thierry et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Laboratoires Horus Pharma (Saint Laurent du Var, France), INRA-AlimH, CNRS, Université de Bourgogne, Regional Council of Burgundy France (PARI Agrale 1), FEDER (European Funding for Regional Economic Development), and French Government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the "Investissements d'Avenir" program with reference ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC Labex. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: This work was partially supported by grants from Laboratoires Horus Pharma (Saint Laurent du Var, France): partial funding of the research project, and Ph.D. fellowship to MT. This point has been added to the text (Paragraph 6 p17). The funders did not interfere with the full and objective presentation of the results, reviewing and finalizing the manuscript, and decision to submit. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* Email: lionel.bretilon@dijon.inra.fr

Introduction

Diabetic retinopathy (DR) and age-related macular degeneration (AMD) are the leading causes of visual loss in Western populations before and after the age of 50 years, respectively [1]. The association between DR and AMD remains controversial. Large-scale population-based studies have reported increased incidence or prevalence of AMD in patients with diabetes or DR [2,3,4,5]. On the contrary, others have failed to find a similar relationship such as the Framingham Eye Study [6] and smaller case-control studies [7,8]. Metabolic syndrome (MetS) is defined as a constellation of clinical criteria including visceral adiposity, elevated blood pressure, hypertriglyceridemia, insulin resistance,

and elevated fasting glycemia. Its prevalence is high worldwide, although it varies from one country to another and depends on defining criteria. Using the NCEP (National Cholesterol Education Program) definition, MetS reached 14.1% of the population in France in 2006–2007 [9] and 22.9% in the US in 2010 [7]. MetS remains a major risk factor for the development of type 2 diabetes (T2D) [10]. The prevalence of diabetic retinopathy (DR) in the diabetic population is high: from 9.9% in T2D adults 18 years and older to 28.5% after the age of 40 years [1]. Diabetes plays a deleterious role on several structures in the eye including the cornea, the lens, the optical nerve head and the retina [11,12]. Although no animal model of T2D recapitulates the late proliferative stages of DR [13], most studies on the consequences

of diabetes on the retina were restricted to the vascular effects of hyperglycemia, including vasopermeability, endothelial cell proliferation and promoted neovascularization [14,15]. However, far less is known on the adaptation and characterization of the retinal changes related to MetS. High-fructose diets have been associated with metabolic changes and excess weight gain that are typical of MetS and may predispose to T2D [14,16,17,18]. This concern was supported mainly by observations in high-fructose-fed rodents that reported hyperinsulinemia, increase of body fat, and hepatomegaly associated with accumulation of lipids in the liver [19,20]. The feeding of rats with high fructose is therefore a suitable and pertinent model for MetS [14]. Choroidal neovascularization (CNV) is the major complication of exudative AMD. The rupture of Bruch's membrane by laser impacts is a commonly used technique to induce CNV in animals [21]. In our study, we sought first to characterize the functional and gene expression changes in the retina of fructose-fed rats, and second to evaluate whether fructose-fed rats would be more prone to developing CNV than control animals.

Materials and Methods

1. Ethical concerns

All procedures were conducted in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statements for the use of animals in ophthalmic and vision research and were approved by the local Animal Care and Use Committee (Comité d'Ethique de l'Expérimentation Animale nr 105, Dijon, France). Personal (nr 21CAE095) and institutional (nr B21231010EA) agreements were obtained according to French regulations.

2. Experimental diets

Standard and 60%-rich fructose diets (Table 1) were purchased from Sniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Germany).

3. Animals

Male Brown Norway rats (6 weeks of age, Charles River, L'Arbresle, France) were housed in controlled temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity (55–60%) conditions with a 12-h light/12-h dark cycle (Animalerie Expérimentale, CSGA, Dijon,

France). After a 7-day-long quarantine, the animals were randomly allocated to the experimental groups corresponding to the feeding of either of the two experimental diets during 1, 3 and 6 months ($n = 24$ per diet and per time point) (Figure 1). Rats had unrestricted access to food and deionized tap water.

4. Argon laser-induced choroidal neovascularization (CNV) in rats

One week before the end of each dietary period (1, 3 or 6 months) (Figure 1), the rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg, Imalgène 1000, Merial, Lyon, France) and xylazine (10 mg/kg, Rompun 2%, Bayer, Puteau, France). Pupils were dilated with 1% tropicamide (Mydriaticum, Laboratoires Théa, Clermont-Ferrand, France). Laser photocoagulation (532 nm, 300 mW, 50 ms, 75 μm , Vitra, Quantel Medical, Clermont-Ferrand, France) was unilaterally performed (5 to 7 spots per eye) in 8 animals per group. The laser spots were delivered around the optic nerve using a slit lamp delivery system and a glass coverslip as a contact lens. The validation of the injury was ascertained at the time of the laser shot by the appearance of a bubble.

5. Retinal and choroidal angiography

Retinal and choroidal angiography was performed every 7 days for the 3 weeks following CNV induction by confocal scanning laser ophthalmoscopy using Heidelberg Retinal Angiograph (HRA1, Heidelberg Engineering, Germany) ($n = 8$ rats per group) (Figure 1). Rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg, Imalgène 1000, Merial) and xylazine (10 mg/kg, Rompun 2%, Bayer). Pupils were dilated with 1% tropicamide (Mydriaticum, Laboratoires Théa). Fluorescein (0.15 mL of 1% saline solution per 300 g body weight, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and Indocyanine Green (ICG) (0.15 mL of 0.4% saline solution per 300 g body weight, Infracyanine, Serb, Paris, France) were injected intravenously via the penile vein. Single pictures and depth scan movies were taken between 5 and 10 min after dye administration. Photographs of the retinal and the choroidal vasculature were recorded at 488 nm for retinal vessel fluorescein angiography and at 795 nm for choroidal ICG angiography. Barrier filters at 500 and 810 nm

Table 1. Composition of the experimental diets.

	Standard diet	Fructose-enriched diet
	In g per kg of diet	
Casein	180	180
Cornstarch	460	90
Sucrose	230	0
Fructose	0	600
Cellulose	20	20
Mineral mix (a)	50	50
Vitamin mix (b)	10	10
Fat: oil mix(c)	50	50

(a) Composition (g/kg): sucrose, 110.7; CaCO_3 , 240; K_2HPO_4 , 215; CaHPO_4 , 215; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100; NaCl, 60; MgO, 40; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1; $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2; K_2CrO_4 , 0.15; NaF, 0.1; $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1; H_2BO_3 , 0.1; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05; KIO_3 , 0.04; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.02; LiCl, 0.015; Na_2SeO_3 , 0.015; NH_4VO_3 , 0.01.

(b) Composition (g/kg): sucrose, 549.45; retinyl acetate, 1; cholecalciferol, 0.25; DL-tocopheryl acetate, 20; phylloquinone, 0.1; thiamine HCl, 1; riboflavin, 1; nicotinic acid, 5; calcium pantothenate, 2.5; pyridoxine HCl, 1; biotin, 1; folic acid, 0.2; cyanocobalamin, 2.5; choline HCl, 200; DL-methionine, 200; p-aminobenzoic acid, 5; inositol, 10.

(c) Composition of the oil mix (%): Rapeseed oil, 18.7; Oleic oil, 38.1; Sunflower oil, 5; Palm oil, 38.1. Omega 6 to omega 3 ratio = 7.5.

doi:10.1371/journal.pone.0112450.t001

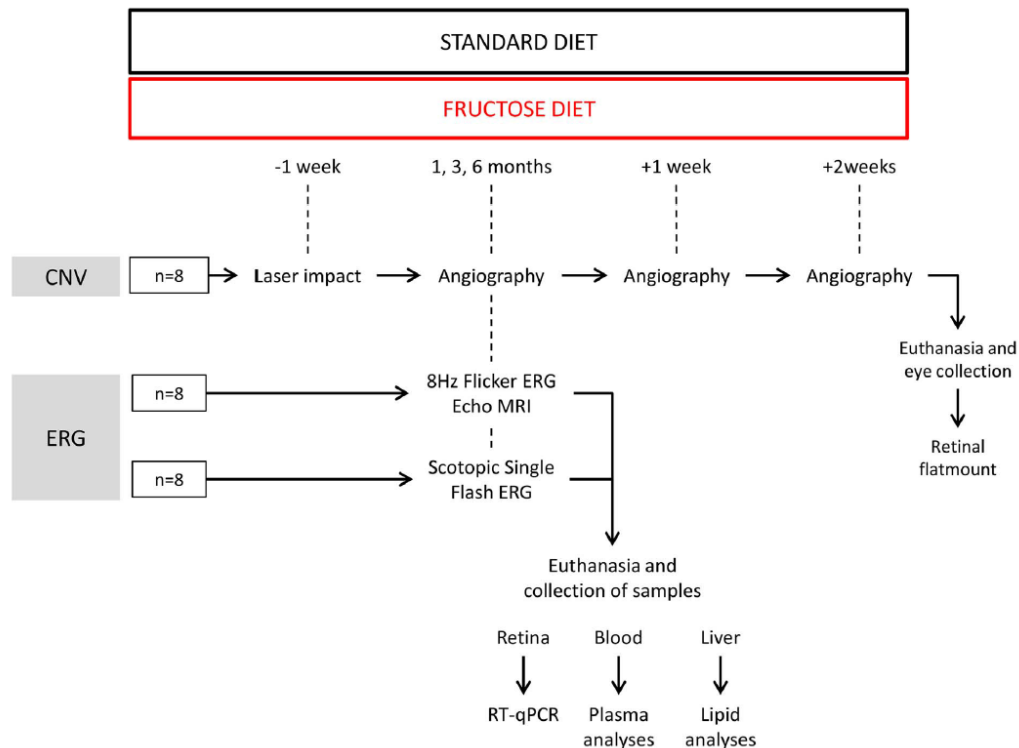


Figure 1. Flow chart of the experimental procedure. CNV: choroidal neovascularization, ERG: electroretinography.
doi:10.1371/journal.pone.0112450.g001

provided the optimal cutoff at the respective peak fluorescence emission values for the two types of angiography. The size of the square scan field was set at 20° and 10°.

6. Semi-quantitative analysis of laser-induced CNV

CNV was semi-quantified in a double-blind manner by two independent investigators on images from ICG angiography 2 and 3 weeks after laser-induced CNV using ImageJ software. The CNV area was delimited on grey-scale images centered on the optic nerve head and measured in pixels. In the 256 values of the grey scale, the lower limit for the detection of CNV (i.e., hyperfluorescence) was 119 ± 13 compared to 80 ± 17 for background noise (mean \pm SD, $n = 8$ independent determinations in different fundi). The ratio of the fluorescence of each laser impact to the optic nerve head area was calculated and averaged per eye ($n = 5$ impacts per eye, $n = 8$ rats per group).

7. Electroretinography

The electroretinograms (ERG) were recorded after 1, 3, and 6 months of feeding ($n = 16$ rats per group) (Figure 1), according to previously described procedures and ISCEV (International Society for Clinical Electrophysiology of Vision) guidelines [22]. Rats were dark-adapted overnight before the experiments. All further procedures were carried out under dim red light ($\lambda < 650$ nm) at a constant temperature of 25°C. Rats were anesthetized by intramuscular injection of ketamine (100 mg/kg, Imalgène 1000, Merial) and xylazine (10 mg/kg, Rompun 2%, Bayer). Pupils were dilated with 1% tropicamide (Mydriaticum, Laboratoires Thea).

After 10 min, rats were positioned on a warming plate, and the corneal electrodes were put in place. The ERG was recorded via corneal electrodes (thin gold wire with a 3-mm ring end) and reference and ground electrodes (silver needle) placed on the forehead and tail, respectively. The recording setup featured a Ganzfeld bowl, an amplifier, and a computer-based control and recording unit (RETI port/scan 21, Stasche & Finger GmbH, Roland Consult, Brandenburg, Germany). ERG responses were recorded from both eyes simultaneously after the rats were placed in the Ganzfeld bowl.

The first ERG examination corresponded to the scotopic single flash, scotopic threshold response (STR) and oscillatory potential (OP) recordings ($n = 8$ rats per group). The band-pass filter width was 1–300 Hz for the recording procedure of scotopic single-flash responses. The stimuli of the scotopic single-flash were recorded with ten increasing intensities from 0.0003 cd.s/m² to 10 cd.s/m². These responses were averaged with an inter-stimulus interval of 5 s (from 1 to 10 cd.s/m²) or 17 s (up to 0.3 cd.s/m²). The band-pass filter width was 0.2–30 Hz for the STR recording procedure. The STR stimuli were recorded with three increasing intensities: -4.60 log, -4.32 log, and -4.02 log cd.s/m². A 2 s inter-stimulus interval was used between these stimuli. After amplification, the signal was digitized and processed. The amplitude and latency of the a- and b-waves were analyzed as previously described [23]. OPs were recorded as previously published [24]. The band-pass filter width was 200–500 Hz. Two stimuli were applied with an inter-stimuli interval of 17 s. After amplification, the signal was digitized and processed on the basis of means of amplitude and

time-latency measurements of each of the four typically characterized peaks (OP1–OP4) [25]. The second flicker ERG examination consisted in fixed frequency 8.02 Hz light stimulation, in order to avoid subharmonic of the frequency of the power supply (set at 50 Hz) ($n = 8$ rats per group). The responses were recorded at ten increasing intensities from 0.0003 cd.s/m² to 10 cd.s/m² with an inter-stimulus interval of 0.1247 s.

8. Body composition analysis

As mentioned in Figure 1, whole body composition was analyzed by quantitative magnetic resonance imaging (EchoMRI 500, EchoMRI, Houston, Texas; Plateforme de phénotypage du petit animal, Université de Bourgogne, AgroSup Dijon, France). Animals were adapted to the environment of the EchoMRI analyzer at least 12 h before measurement with free access to food and water. Scans were taken by placing animals in a thin-walled plastic cylinder (3 mm thick, 6.8- or 8.2-cm inner diameter, based on body weight), with a cylindrical plastic insert added to limit the movement of the animals. Within the tube, the animals were briefly subjected to a low-intensity (0.05 Tesla) electromagnetic field to measure fat, lean mass, free water, and total body water, as described by Tinsley [26]. Briefly, this system generates a signal that modifies the spin patterns of hydrogen atoms within the subject, and uses an algorithm to evaluate the resulting T1 and T2 relaxation curves specific to each of the four components measured: fat mass, lean muscle mass equivalent, total body water, and free water. Quantitative magnetic resonance scans were taken in triplicate ($n = 8$ rats per group).

9. Collection of samples

The animals ($n = 16$ rats per group) were fasted overnight. The rats were deeply anesthetized with pentobarbital (Ceva, Santé animale, Libourne, France). Blood was collected from the abdominal artery in EDTA tubes and plasma was prepared by centrifugation (20 min, 3000 rpm) and stored at -80°C until further analysis. Rats were then euthanized by exsanguination. Retinas were dissected and stored in RNAlater solution (Qiagen, Courtaboeuf, France) until RNA extraction. The liver was collected and stored at -80°C until lipid and fatty acid analyses. Eyes were collected at the end of the CNV protocol for flatmounting of the retinas (see paragraph 2.13), two weeks after the end of the diet period ($n = 8$ per group) (Figure 1).

10. Lipid analyses

Lipids were extracted from the liver ($n = 8$ per group) according to the Folch method [27] and submitted to transmethylation of the fatty acids using boron trifluoride in methanol according to Morrison and Smith [28]. Fatty acid methyl esters were subsequently extracted with hexane and analyzed using gas chromatography on a Hewlett Packard Model 5890 gas chromatograph (Palo Alto, CA, USA) using a CPSIL-88 column (100 m, 0.25 mm i.d., 0.20- μm film thickness, Varian, Les Ulis, France) equipped with a flame ionization detector. Hydrogen was used as the carrier gas (inlet pressure, 210 kPa). The oven temperature was held at 60°C for 5 min, increased to 165°C at $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and held for 1 min and then to 225°C at $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and finally held at 225°C for 17 min. The injector and the detector were maintained at 250°C . Fatty acid methyl esters were identified by comparison with commercial and synthetic standards (Sigma Aldrich, L'Isle d'Abeau, France). The data were processed using the EZChrom Elite software (Agilent Technologies, Massy, France) and reported as a percentage of the total fatty acids.

The distribution of lipids into phospholipids, triacylglycerols, free fatty acids, free cholesterol, and cholesteryl esters in the neural

retina ($n = 8$ per group) was determined using a combination of thin-layer chromatography on silica gel-coated quartz rods and flame ionization detection (Iatroscan system, Iatron, Tokyo, Japan), according to Ackman's technique [29] and published by our group [30]. The values obtained for each compound were corrected according to their response factor using specific calibration curves, as previously published [31]. Data were reported as a percentage of the total lipids in the sample.

11. Plasma analyses

Glycemia was evaluated using a blood glucose system (One Touch Ultra, Lifescan) ($n = 8$ rats per group). Cholesterol, triacylglycerol, HDL, LDL, and fructosamine were quantified by standard automatic analyzers at the Clinical Chemistry Department of the Dijon University Hospital (Dijon, France) ($n = 8$ rats per group). Plasma insulin and leptin levels ($n = 8$ rats per group) were quantified on a 96-well plate using the Rat Metabolic Magnetic Bead Panel and assessed by Luminex technology (Biorad Bioplex 200 system, Life Sciences, Marnes-la-Coquette, France). The analyses were performed according to the manufacturers' protocols (Milliplex kit, Merck Millipore).

12. Analysis of gene expression in the neurosensory retina

Total RNA from the neurosensory retina ($n = 8$ in each group) were extracted using a commercial kit following the manufacturer's procedure (RNAqueous, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). cDNA were prepared using oligo-dT as the primer and the High-Capacity RNA-to-cDNA Master Mix from Applied Biosystems. The quality and concentration of the cDNA samples were checked by qPCR analysis of glucuronidase beta (GUSB) expression using TaqMan technology (ABI7900 Fast Real-Time PCR system, Applied Biosystems). The expression of 61 genes (Table 2), including four control genes and genes coding for lipid metabolism, fatty acid transport, inflammation, neovascularization, and chemokines, was analyzed using qPCR with the TaqMan Array Plates FAST Custom (ABI7900 Fast Real-Time PCR system, Applied Biosystems).

13. Quantification of phagocytic cells in flat-mounted retinas

Rats fed 3 months with standard or fructose diets and submitted to laser-induced CNV were euthanized and enucleated 3 weeks after laser photocoagulation (Figure 1). The eyeballs were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) for 50 min, washed in PBS azide and stored at 4°C in PBS until preparation of retinal flatmounts. The cornea was incised, the lens was taken out, and four radial cuts were made on the eyecups. The vitreous was removed with forceps, and the retinas were gently isolated and flattened on microscope slides and circled by a hydrophobic pen (Dakopen, Dakocytomation, Trappes, France) in 200 μL of a blocking solution (1% BSA in PBS pH 6.8, 0.5% Tween 20) for 1 day and stored at 4°C under stirring. PBLeC washing solution (PBS1X, pH 6.8, 0.1 mM CaCl_2 , 0.1 mM MgCl_2 , 1% Tween 20) was used twice to wash the retinal flatmounts (200 μL per washing for 5 min). Primary mouse antibody raised against rat anti-CD68 (dilution 1:100) (MCA341R, AbD Serotec) was incubated overnight at 4°C under stirring. Five washings with PBS1X were then carried out, and retinal flatmounts were incubated with secondary antibody (dilution 1:100) (A1101, anti-mouse Alexa 488, Life Technologies) for 2 h. Five washings in PBS1X were performed and the slides were coverslipped with a fluorescence mounting medium

Table 2. List of the genes which expression was analyzed by RT-qPCR.

Gene symbol	Gene name	Reference sequence
Abca1	ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 1	NM_178095.2
Abca4	ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 4	NM_001107721.1
Abcg1	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 1	NM_053502.1
Akt2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	NM_017093.1
Alox12	arachidonate 12-lipoxygenase	NM_001105798.1
Alox5	arachidonate 5-lipoxygenase	NM_012822.1
Angptl3	angiopoietin-like 3	NM_001025065.1
Apoa4	apolipoprotein A-IV	NM_012737.1
Apob	apolipoprotein B	NM_019287.2
ApoE	apolipoprotein E	NM_138828.3
Asmt	acetylserotonin O-methyltransferase	NM_144759.2
Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	NM_031530.1
Cd36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	NM_031561.2
Cyp27a1	cytochrome P450, family 27, subfamily a, polypeptide 1	NM_178847.2
Cyp46a1	cytochrome P450, family 46, subfamily a, polypeptide 1	NM_001108723.1
Cyp7a1	cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1	NM_012942.1
Edn1	endothelin 1	NM_012548.2
Fas	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	NM_139194.2
Foxa2	forkhead box A2	NM_012743.1
Gfap	glial fibrillary acidic protein	NM_017009.1
Hif1a	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	NM_024359.1
Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	NM_013134.2
Htra1	HtrA serine peptidase 1	NM_031721.1
Igf1	insulin-like growth factor 1	NM_001082477.2
Il1b	interleukin 1 beta	NM_031512.2
Il6	interleukin 6	NM_012589.1
Insig1	insulin induced gene 1	NM_022392.1
Ipcefl	interaction protein for cytohesin exchange factors 1	NM_001170799.1
Irs1	insulin receptor substrate 1	NM_012969.1
Itgb2	integrin, beta 2	NM_001037780.2
Lcat	lecithin cholesterol acyltransferase	NM_017024.2
Ldlr	low density lipoprotein receptor	NM_175762.2
Lep	leptin	NM_013076.3
Lepr	leptin receptor	NM_012596.1
Lpl	lipoprotein lipase	NM_012598.2
Lrp1	low density lipoprotein-related protein 1 (alpha-2-macroglobulin receptor)	NM_001130490.1
Mapk8	mitogen-activated protein kinase 8	NM_053829.1
Mtnr1a	melatonin receptor 1A	NM_053676.2
Mtnr1b	melatonin receptor 1B	NM_001100641.1
Mttp	microsomal triglyceride transfer protein	NM_001107727.1
Nos2	nitric oxide synthase 2, inducible	NM_012611.3
Nox1	NADPH oxidase 1	NM_053683.1
Nox3	NADPH oxidase 3	NM_001004216.1
Nr1d1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	NM_001113422.1
Nr1h3	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	NM_031627.2
Pltp	phospholipid transfer protein	NM_001168543.1
Ppara	peroxisome proliferator activated receptor alpha	NM_013196.1
Ppard	peroxisome proliferator-activated receptor delta	NM_013141.2
Rela	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	NM_199267.2
Rxra	retinoid X receptor alpha	NM_012805.2

Table 2. Cont.

Gene symbol	Gene name	Reference sequence
Rxrb	retinoid X receptor beta	NM_206849.3
Rxrg	retinoid X receptor gamma	NM_031765.1
Slc2a2	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2	NM_012879.2
Slc2a4	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	NM_012751.1
Srb1	scavenger receptor class B, member 1	NM_031541.1
Tnf	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	NM_012675.3
Vegfa	vascular endothelial growth factor A	NM_001110333.1
Housekeeping genes		
Gadd45a	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	NM_024127.2
Gusb	glucuronidase, beta	NM_017015.2
B2m	beta-2 microglobulin	NM_012512.2
18S	Ribosomal 18S sub-unit	X_03205

doi:10.1371/journal.pone.0112450.t002

(Dakocytomation, Trappes, France). Retinas were examined under a confocal fluorescence microscope (Leica SP2, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany, Plate-forme DIMACELL, Dijon, France). Images (165 $\mu\text{m} \times 165 \mu\text{m}$) were taken for quantification of the fluorescence in the experimental and fellow retinas using ImageJ software. Images from confocal fluorescence microscopy were converted in binary mode. The number of pixels corresponding to the value of 255 on the gray scale was considered as CD68-positive cells. Five images per eye for each diet (standard and fructose diets in both experimental and fellow retinas) were evaluated and averaged.

14. Statistical analyses

All analyses were conducted using GraphPad Prism software version 4.0. The level of statistical significance of the two-tailed tests was set at $p \leq 0.05$ and 0.01. A nonparametric Mann & Whitney test was used to compare body fat, circulating insulin and leptin levels, fatty acids, and lipid classes in the liver and non parametric Kruskal-Wallis test for quantification of CNV and CD68-immunostaining in the standard and fructose groups. Statistical analysis of gene expression was performed using integrated statistical analysis of data assist software (Student *t*-test) and a heat map was performed using the fold change values. Fold changes above the value of 1.5 was considered as significant. Dark green was used to represent a 10-fold change downregulation of gene expression, dark red was used to represent 7-fold change upregulation of gene expression. The levels of statistical significance were set at $p \leq 0.1$, 0.05, and 0.01.

Results

1. Fructose diet triggered metabolic syndrome in the rat

The fructose diet did not affect body weight (data not shown), but significantly increased body fat by 17% compared to rats of the control group at the corresponding ages (Figure 2). Plasma analyses revealed significant hyperleptinemia after 1 and 3 months of fructose feeding ($p = 0.03$ and 0.001, respectively), and hyperinsulinemia at 3 and 6 months ($p = 0.05$ and 0.04, respectively) (Figure 3). On the other hand, glycemia and plasma levels of HDL and LDL cholesterol and fructosamine remained constant (data not shown). The analysis of the lipid classes in the liver revealed a significant increase of triacylglycerol levels after 3

and 6 months of diet (five- and threefold increase, respectively, Figure 4), highlighting the development of liver steatosis induced by the fructose diet. As expected, increased liver triacylglycerols were associated with accumulation of palmitic and oleic acids (Table 3), which remain the prominent fatty acids accumulating at the time of steatosis [32,33].

2. Metabolic syndrome favored laser-induced choroidal neovascularization in the rat via activation/infiltration of phagocytic cells in the retina

CNV did not develop 1 week after laser, as illustrated by the lack of fluorescence in the scars created by the laser spots (Figure 5A). Hyperfluorescent areas appeared in the lesions compared to the surrounding choroid after 2 (images not shown)

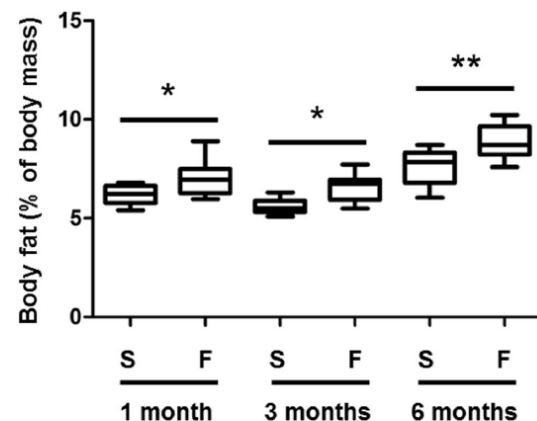


Figure 2. Body fat is increased in rats fed with a 60%-rich fructose diet. Body fat (expressed as % of body mass) was quantified by EchoMRI in the rat after 1, 3, and 6 months of feeding with either the standard (S) or 60%-rich fructose (F) diet. * and ** statistically different at $p \leq 0.05$ and 0.01, respectively (Mann & Whitney test). The bottom and top of the box are the first and third quartiles, and the band inside the box is the median. The ends of the whiskers are 1 standard deviation above and below the mean of the data ($n = 8$ rats per group). doi:10.1371/journal.pone.0112450.g002

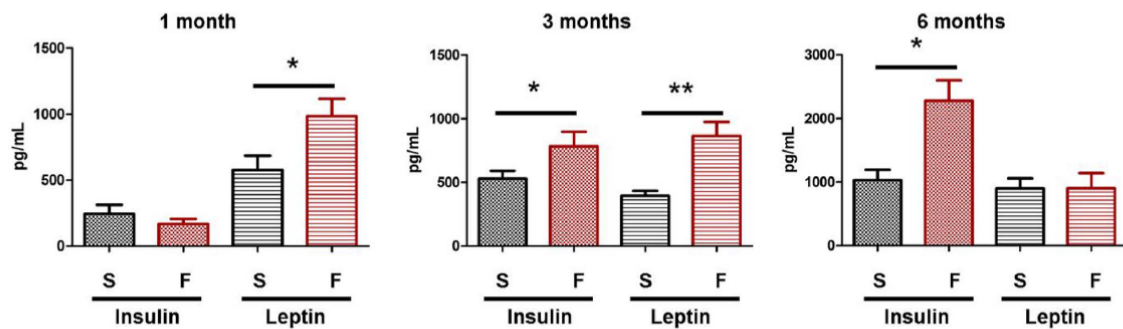


Figure 3. Insulinemia and leptinemia are increased in rats fed with a 60%-rich fructose diet. Plasma insulin and leptin (expressed in pg per mL of plasma) were quantified in the rat after 1, 3, and 6 months of feeding with either the standard (S) or 60%-rich fructose (F) diet. * and ** statistically different at $p \leq 0.05$ and 0.01 , respectively (Mann & Whitney test). Values are given as means \pm SD ($n = 8$ rats per group). doi:10.1371/journal.pone.0112450.g003

and 3 weeks (Figure 5A). These areas correspond to filling of the vessels with ICG dye and thus to the neovascularization process. Figure 5B presents semi-quantitative CNV data. A significant CNV enhancement was observed after 1 month of fructose-feeding 2 and 3 weeks after laser injury compared to the standard diet ($p = 0.03$, $p = 0.0003$, respectively). After 3 months of feeding, fructose-fed rats showed exacerbated CNV development only at week 2 after laser impacts ($p = 0.0065$). No significant CNV was observed after 6 months of feeding with the high-fructose diet ($p > 0.05$). Analysis of CD68-positive immunostaining in flat-mounted retinas (Figure 6A) showed a significant increase of CD68 expression in fructose-fed rats compared to standard-fed animals in fellow retinas ($p \leq 0.01$, Figure 6B). CNV significantly enhanced CD68 immunostaining in fructose-fed rats, suggesting massive infiltration of circulating macrophages and/or activation of resident microglia.

3. Fructose diet-modulated gene expression in the retina

Figure 7 presents the data of gene expression in the retina of fructose-fed rats by comparison to animals fed the standard diet. The results show significant upregulation of the proangiogenic genes *Vegfa* at 1 month ($p \leq 0.01$), 3 months ($p \leq 0.05$), and 6 months ($p \leq 0.05$) and *Hif1a* at 6 months ($p \leq 0.1$). Meanwhile *Leptin* ($p \leq 0.1$) and *Mapk8* genes ($p \leq 0.01$) were upregulated at 1 month. In contrast, melatonin receptor genes (*Mtnr1a* and

Mtnr1b) were downregulated after 1 and 3 months of diet ($p \leq 0.1$). At 3 months, fructose feeding induced upregulation of several genes coding nuclear factors (*Rxrg*, *Nr1h3*, $p \leq 0.1$), proteins involved in lipid metabolism including *Pltp* ($p \leq 0.1$), *Lcat*, and *Cd36* ($p \leq 0.05$), cell death inflammation (*Tnf*, $p \leq 0.1$), and diabetes (*Irs1*, *Slc2a2*, $p \leq 0.1$). After 6 months of fructose feeding, we noted down regulation of genes involved in photoreceptor signaling (*Abca4*, $p \leq 0.1$) and lipid metabolism: *Apoa4* and *ApoB* ($p \leq 0.05$), although *Pltp* remained upregulated ($p \leq 0.1$).

4. Rod sensitivity to light was partially lost in metabolic syndrome

The amplitudes and implicit times of the a- and b-waves of the ERG are shown in Figure 8A. No significant effect of fructose feeding was reported, although a trend was observed for the reduction of the b-wave amplitude in fructose-fed rats. To further characterize the changes induced by the fructose diet, additional protocols were performed. Flicker ERG is a suitable technique to specifically record rod and cone sensitivity to light stimulus [34]. It was recorded after 1, 3, and 6 months in both fructose-fed rats and animals fed the standard diet. The results are shown in Figure 8B. The data demonstrated no effect of fructose on rod or cone sensitivity at 1 and 3 months. On the contrary, the data obtained in rats fed with fructose for 6 months exhibited a shift to the right

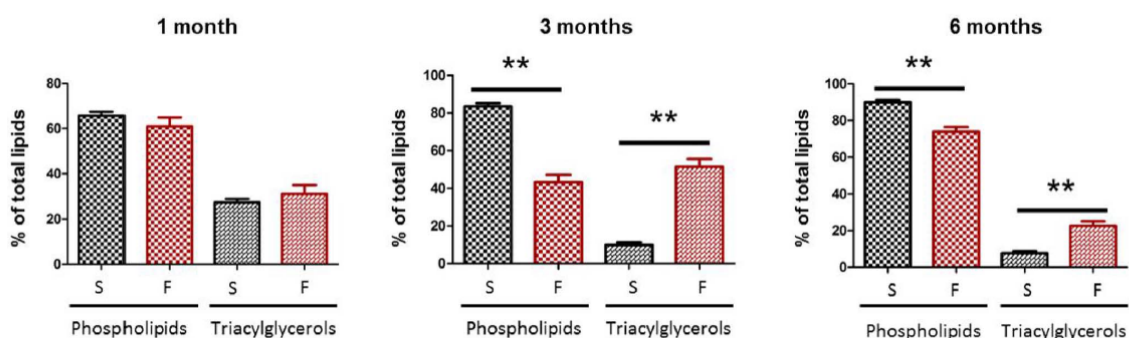


Figure 4. Liver steatosis is increased in rats fed with a 60%-rich fructose diet. Liver steatosis was evaluated by quantifying triacylglycerols (expressed in % of total lipids) in the liver of the rat after 1, 3, and 6 months of feeding with either the standard (S) or 60%-rich fructose (F) diet. ** statistically different at $p \leq 0.01$ (Mann & Whitney test). Values are given as means \pm SD ($n = 8$ rats per group). doi:10.1371/journal.pone.0112450.g004

Table 3. Fatty acid composition of total lipids in the liver of rats fed with either the standard or 60%-rich fructose diet during 1, 3, and 6 months.

	1 month		3 months		6 months	
	Standard	Fructose	Standard	Fructose	Standard	Fructose
Fatty acids						
C16:0 (palmitic acid)	971±93.7	1218±210.1 **	1116±39.0	1790±213.9 **	1081±179.7	1234±105.0
C18:0 (stearic acid)	651±39.5	649±98.0 *	983±52.4	392±108.3 **	857±152.4	732±89.4 **
C18:1 n-9 (oleic acid)	894±154.8	1220±335.8	858±126.4	1795±63.6 **	1103±168.3	1560±253.4
C18:2 n-6 (linoleic acid)	579±76.6	607±80.2	586±36.8	280±67.2 **	587±101.6	487±45.3
C22:6 n-3 (docosahexaenoic acid)	241±17.0	260±36.0	275±26.3	95±35.5 **	290±38.6	246±34.2

* and **, statistically different from the data in the corresponding standard group at $p \leq 0.05$ and 0.01, respectively (Mann & Whitney test). Values are means \pm SD (n = 8 per group).
doi:10.1371/journal.pone.0112450.t003

of the maximal response of rods ($\Delta = 0.5 \log(I)$). This illustrates that a higher light intensity was required to reach the maximal response of rods, suggesting partial loss of rod sensitivity induced by the fructose diet. Oscillatory potentials (OPs) were further analyzed. The amplitudes and implicit times of the four OPs are presented in Figure 8C. A significant decrease of OP2 was observed in fructose-fed rats as illustrated in the insert of Figure 8C ($p \leq 0.05$).

Discussion

MetS is a major risk factor for T2D and DR. Most studies on DR focused on the mechanisms and consequences of hyperglycemia in retinal vessels. These data highlighted the prominent role of oxidative stress, inflammation and hemostatic factors including VEGF secretion in the complications of DR, namely retinal edema and retinal neovascularization [12,35,36]. Our data showed that feeding Brown Norway rats for 1 and 3 months with a 60%-rich fructose diet induced body adiposity and hyperleptinemia. Hyperinsulinemia was reported after 3 and 6 months of diet (Figure 3), suggesting the development of insulin resistance in a prediabetic state [37]. These data are consistent with previous reports using fructose diet as a model to induce insulin resistance in rats [38,39] and more generally describing some features of MetS [40].

Most large-scale population-based studies reported increased incidence or prevalence of AMD in patients with diabetes or DR [2,3,4,5], with the exception of the Framingham Eye Study [6] or smaller case-control studies [7,8]. The matter is subject to controversy. At least two studies reported a consistent and similar association between diabetes and neovascular AMD, with an odds ratio of 1.88 (95% CI, 1.07–3.31) in the Age-Related Eye Disease Study [2] and 1.81 (95% CI, 1.10–2.98) in the EUREYE study [5]. Others found an association with geographic atrophy [4]. Nevertheless and interestingly, in those reports diabetes and early AMD appeared to be unrelated. These data reinforced our hypothesis that MetS as a risk factor for T2D is a promoting factor for neovascular complications in the retina.

On the one hand, the primary objective of this study was to characterize the adaptation of the retina to MetS. Flicker ERG data revealed partial loss of rod sensitivity to light stimulus after 6 months of fructose feeding (Figure 8B). This is consistent with downregulation of the *Abca4* gene after 6 months of fructose feeding, accounting for ABCA4 being physiologically involved in the retinoid cycle and mutations in *Abca4* being associated with cone and rod dystrophies [41]. It was previously reported that the sensitivity of photoreceptors was affected in DR and could be attributed to transduction abnormalities [42]. Alterations of photoreceptors were consistently observed in a model of streptozotocin-induced diabetic rats [43]. We also suggested a slight decrease of functionality of inner retinal cells by scotopic standard ERG, since the b-wave amplitude was lowered, although the difference from controls failed to reach statistical significance. We observed a decrease of OP2 amplitude in fructose-fed rats. Although the exact origin of OPs is still uncertain, OPs most probably reflect neuronal activity of bipolar cells and amacrine cells [44]. Several studies pointed out the association between alterations of OPs and diabetes. Indeed OP2 and OP4 responses were delayed in streptozotocin-induced diabetic rats [45]. Previous studies reported the association between the reduction of OP amplitudes and the severity of diabetic retinopathy [46,47,48], or even with the greater probability of developing DR [49]. Furthermore, patients with retinopathy and cone-rod diseases presented delayed OP2 despite normal b-wave peak times [50].

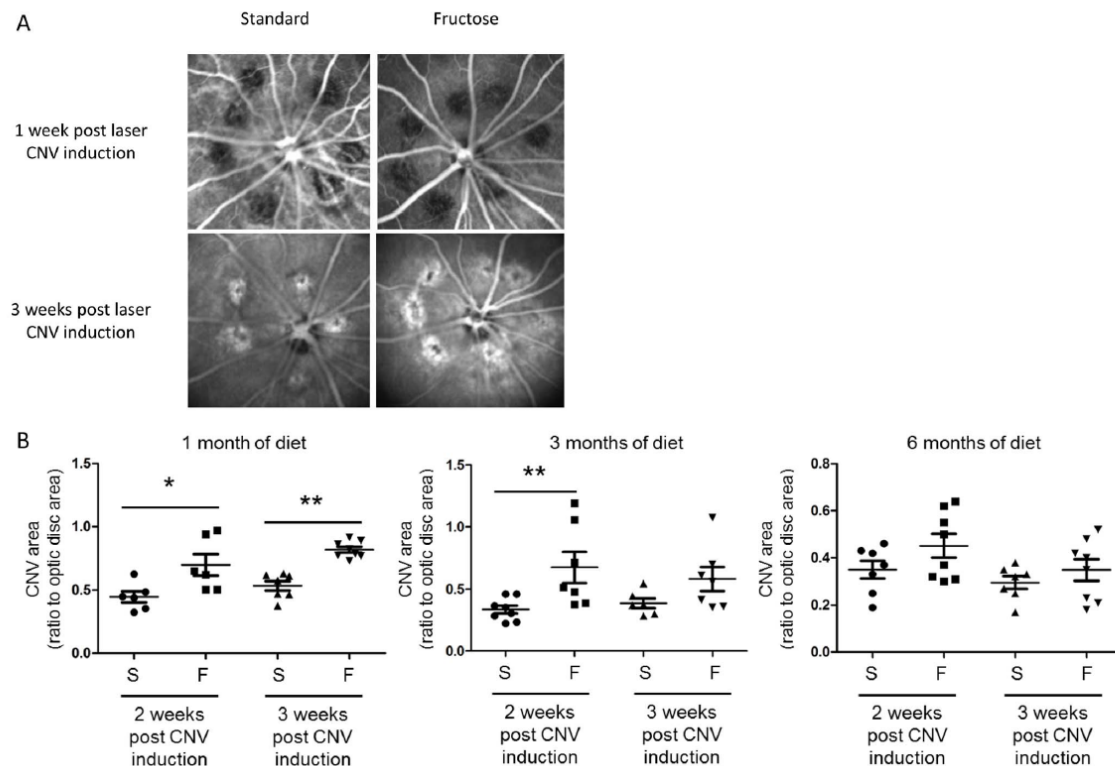


Figure 5. Laser-induced choroidal neovascularization (CNV) is enhanced in rats fed with a 60%-rich fructose diet. A. Representative images of choroidal indocyanine green angiography taken after 1 and 3 weeks post laser-induced CNV in rats fed with either the standard or 60%-rich fructose diet. Images were taken at 20 \times by confocal scanning laser ophthalmoscopy at 795 nm. The black holes in the eye fundi at 1 week post laser-induced CNV correspond to the breaks created by the laser spots (532 nm, 300 mW, 50 ms, 75 μ m) in the retinal pigment epithelium and Bruch's membrane. CNV correspond to the filling of the new vessels by indocyanine green. **B.** Semi-quantification of CNV (ratio between the area of indocyanine green fluorescence and optic disc area) at 2 and 3 weeks after laser-induced CNV in the rat fed during 1, 3, and 6 months with either the standard (S) or 60%-rich fructose (F) diet. * and ** statistically different at $p \leq 0.05$ and 0.01, respectively (Kruskal-Wallis test). Values are given as individual data and means \pm SD ($n=8$ rats per group). doi:10.1371/journal.pone.0112450.g005

On the other hand, the secondary aim of our study was to investigate whether MetS represents a favorable environment for the development of CNV. Laser photocoagulation was used to trigger neovascularization, as used by others [21]. Laser spots create damage in the Bruch membrane that favors endothelial cells, pericytes, and inflammatory cells entering the RPE and sub-retinal space and forming CNV [21]. The present data showed that the consequences of a fructose diet were associated with exacerbated development of CNV after 1 and 3 months of feeding. We observed massive infiltration of CD68-positive phagocytic cells in the retina of rats submitted to laser injury and fed with fructose compared to rats fed with the standard diet. These cells may either be infiltrating macrophages and/or activated microglia. Enhanced CNV was correlated with overexpression of *VegfA* and *Leptin* genes in the retina. Leptin was shown to promote angiogenesis [51] and retinal neovascularization [52]. Various growth factors, including VEGF, are involved in the development of neovascularization [36]. Our data consistently illustrated the association between VEGF induction and enhanced CNV at early phases of MetS, i.e., at 1 and 3 months. In our model, MAPK8 was upregulated at 1 month. MAPK8 is a member of MAPK family that encompasses Jun kinases (JNK). JNKs are critical factors in

the development of CNV, especially via the activation of macrophages [53]. Using the same model of CNV development as ours in mice, Du and coworkers elegantly showed that JNK is required for macrophage recruitment and demonstrated that JNKs inhibition and JNK1 knock-down reduced VEGF expression and lowered CNV [54]. In our model, MAPK8 overexpression was transient and restricted to 1 month, but might be sufficient to promote macrophage infiltration in the retina and further induce VEGF expression over a longer period of time, up to 6 months. The cholesterol-27-hydroxylase (CYP27A1) gene was significantly downregulated at 1 month in fructose-fed rats. The association between CYP27A1 and enhanced development of CNV in fructose-fed rats is consistent with data in CYP27A1 knock-out animals, showing vascular changes in the retina, including sprouting of vessels from the choroid into the neurosensory retina [55].

It must be noted that these changes in gene expression were observed in retinas of fructose-fed animals that were not submitted to CNV induction. Our findings therefore strongly support the notion that MetS constitutes a favorable environment for the development of CNV. In this context, the aforementioned effects cannot be associated with the well-recognized role of hyperglycemia

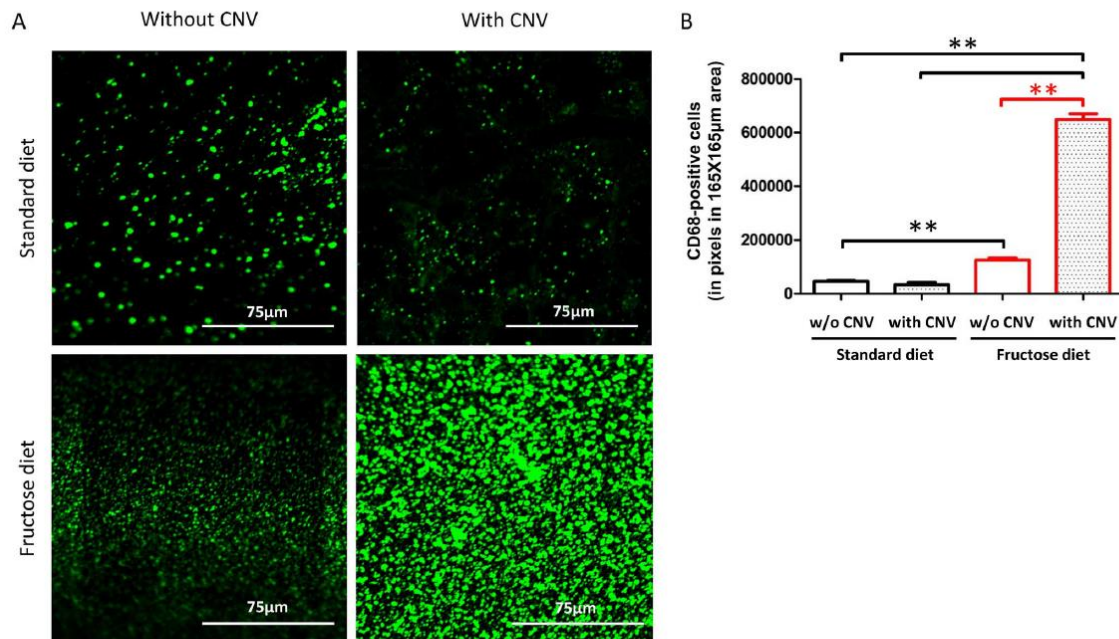


Figure 6. The number of CD68-positive cells is increased in the retina of rats fed with a 60%-rich fructose diet and submitted to laser-induced choroidal neovascularization (CNV). **A.** Representative confocal images of CD68-positive cells (revealed by an Alexa 488-labelled secondary antibody) in flat-mounted retinas of rats fed during 3 months with either the standard or the 60%-rich fructose diet and submitted or not to laser-induced CNV. Images corresponding to 165 µm×165 µm of the retinal area were taken 3 weeks post laser-induced CNV. **B.** Quantification of CD68-positive cells in flat-mounted retinas of rats fed during 3 months with either the standard or fructose diet, and submitted or not to laser-induced CNV. ** statistically different at $p \leq 0.01$ (Kruskal-Wallis test). Values are expressed in pixels of fluorescence in the area corresponding to 165 µm×165 µm of the retina; values are given as means \pm SD.
doi:10.1371/journal.pone.0112450.g006

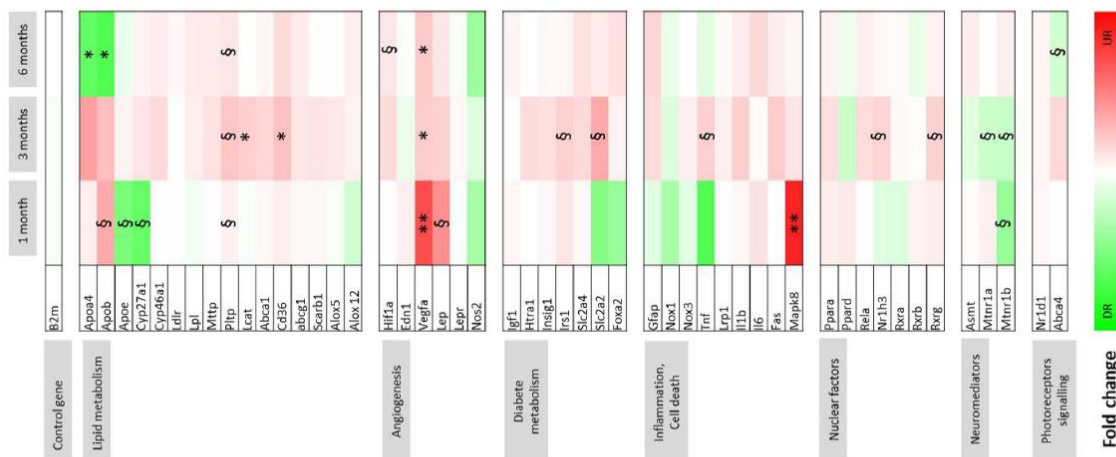


Figure 7. Gene expression changes in the neurosensory retina induced by a 60%-rich fructose diet in the rat. Data of gene expression were obtained by RT-qPCR and represented as a heat map. Fold change is indicated in the color scale, green indicates downregulation (up to 10-fold repression) and red indicates upregulation (up to 7-fold induction) in the retina of rats fed with the 60%-rich fructose diet by comparison to the rats fed with the standard diet at the corresponding ages ($n = 8$ per group). \$, * and **, statistically different at $p \leq 0.1$, 0.05 and 0.01, respectively (Student t-test, $n = 8$ per group).
doi:10.1371/journal.pone.0112450.g007

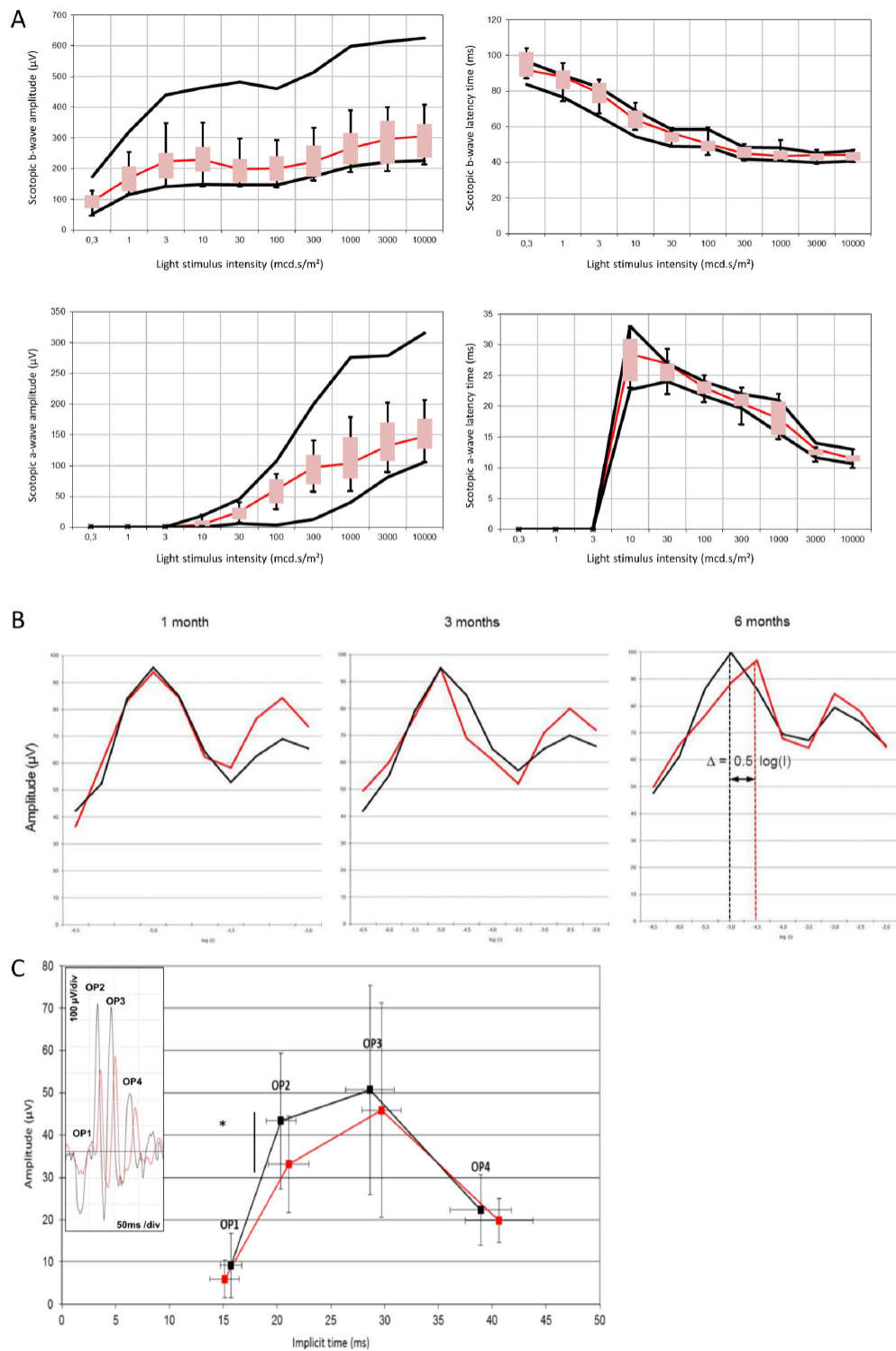


Figure 8. Electroretinographic changes induced by a 60%-rich fructose diet in the rat. **A.** Scotopic single flash response of dark-adapted rats after 6 months feeding with either the standard or 60%-rich fructose diet ($n=8$ per group). Scotopic b-wave and a-wave amplitudes (in μV), b-wave and a-wave latency times (in ms) were plotted as a function of light stimulus intensity (in $mcd.s/m^2$). Black lines show normal range given by the 5% and 95% percentile of the rats fed with the standard diet ($n=8$ per group). Box plots correspond to the 5% and 95% percentile of the rats fed with the 60%-rich fructose diet ($n=8$ per group). Statistically significant changes are observed when box plots are outside of the range given by the 5% and 95% percentile of the rats fed with the standard diet. **B.** 8.02 Hz Flicker electroretinographic data of the rats fed with either the standard (black traces) or 60%-rich fructose (red traces) diet during 1, 3, and 6 months. Data of the amplitude are plotted in amplitude (in μV) of the electroretinographic response as a function of light stimulus intensity (log value) ($n=8$ per group). The first peak corresponds to the maximal response of rods and the second peak to the maximal response of cones [34]. A shift to the right of the first peak in the 60%-rich fructose fed rats is indicative of the loss of sensitivity of the rod photoreceptors. **C.** Amplitude (in μV) and implicit time (in ms) of the four oscillatory potentials (OP) of dark-adapted rats fed during 6 months with either the standard (black traces) or 60%-rich fructose (red traces) diet. Representative raw ERG is presented in the insert to illustrate the reduced amplitude of OP2, and to a lesser extent of OP3, in rats fed a 60%-rich fructose diet (in red) compared to standard diet (in black). * statistically different at $p \leq 0.05$ (Mann & Whitney test). Values are given as means \pm SD ($n=8$ per group). doi:10.1371/journal.pone.0112450.g008

in DR, since the fructose diet did not induce elevated glycemia. Our work therefore adds a new paradigm for the development of CNV in the context of MetS. We suggest that MetS per se may trigger mechanisms that are required for the development of neovascularization, including gene expression changes (*Mapk*, *Vegf*, and *Leptin* induction) and macrophage infiltration. Both circulating and *in situ* leptin and VEGF may be the key factors for the development of CNV in MetS, given that elevated leptin levels were reported to increase the risk for MetS in humans [56]. In the present study, elevated plasma leptin levels were associated with enhanced CNV at 1 and 3 months, whereas similar to controls hyperleptinemia was reported at 6 months while no CNV was promoted. Secondly, in a large clinical study investigating 1802 patients, elevated circulating VEGF levels were positively associated with MetS [57].

We must acknowledge several limitations in our study. First, feeding rats with fructose remains a model of MetS. Visceral adiposity, elevated blood pressure, hypertriglyceridemia, insulin resistance, and elevated fasting glycemia are hallmarks of MetS in humans. Accounting the lifespan of rats compared to humans, our results in rats 7 weeks of aged fed from 1 to 6 months may be relevant to MetS in young to middle-aged adults. We reported increased body fat, hyperinsulinemia, hyperleptinemia, but no hypertriglyceridemia, as was previously shown in rats fed with fructose [58]. Therefore, dietary exposure to fructose would merely be considered as a partial model of MetS, by predisposing cells and organs to chronic conditions of MetS [14].

This work showed, in a timely manner, the limitation of the time-course consequences of fructose feeding since no hyperleptinemia was detected after 6 months. This remediation of the effects may likely be due to the organism's long-term adaptive response. Nevertheless, one should note the consistency of these results given that leptin was considered a pro-angiogenic factor and no increased CNV was observed at this time point. Fructose diets are reported to promote oxidative stress and inflammation [14]. Although we did not ascertain these consequences in the retina, our data showing macrophage infiltration and/or microglia activation in the retina of fructose-fed rats is consistent with this

hypothesis. As recently published, macrophages may be activated by oxidative damage in the retina and may participate in AMD pathogenesis [59]. Secondly, laser-induced neovascularization must be considered a model for CNV, but not for AMD. Until now, no animal model shows all the features of AMD, especially because no rodent model has a macula and spontaneously develops CNV. Despite its artificial nature, the laser model is currently the standard animal model of CNV and is widely used in both fundamental research and preclinical trials [21].

In conclusion, this study clearly showed that feeding rats with a high-fructose diet has detrimental consequences on the sensitivity of rod photoreceptors to light. In addition, high fructose generates a favorable environment for the development of neovascularization in the retina.

Acknowledgments

We thank Prof. Laurence Duvalard (Department of Clinical Chemistry, Dijon University Hospital, Dijon, France) for providing access to the analytical platform, Serge Monier (Dijon University Hospital, Dijon, France) for helping us analyze plasma samples with flow cytometry, Jean François Merlin (Plateau technique de phénotypage métabolique et comportemental du petit animal, INSERM, University of Burgundy, AgroSup, Dijon, France) for his assistance and advice in EchoMRI, and Christine Arnould (Plate forme DIMACELL, INRA, Université de Bourgogne, Dijon, France) for her assistance in confocal microscopy. We are grateful to Dr. Gérard Lizard (University of Burgundy, Dijon, France) and Dr. Corinne Joffre (INRA and University of Bordeaux, Bordeaux, France) for participating in the scientific advisory board of MT's fellowship. We acknowledge Linda Northrup (PhD, ELS, English Solutions, Voiron, France) for the English language editing of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MT LB. Performed the experiments: MT BP SG BB SGN LB. Analyzed the data: MT LB. Contributed reagents/materials/analysis tools: MT VF BP NA SG SGN LB. Wrote the paper: MT NA AMB CCG LB.

References

- Klein R, Klein BEK (2013) The Prevalence of Age-Related Eye Diseases and Visual Impairment in Aging: Current Estimates. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: ORSF5-ORSF13.
- Clemons TE, Milton RC, Klein R, Seddon JM, Ferris FL 3rd (2005) Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19. *Ophthalmology* 112: 533–539.
- Hahn P, Acquah K, Cousins SW, Lee PP, Sloan FA (2013) Ten-Year Incidence of Age-Related Macular Degeneration According to Diabetic Retinopathy Classification Among Medicare Beneficiaries. *Retina* 33: 911–919 910.1097/IAE.1090b1013e3182831248.
- Mitchell P, Wang JJ (1999) Diabetes, fasting blood glucose and age-related maculopathy: The Blue Mountains Eye Study. *Aust N Z J Ophthalmol* 27: 197–199.
- Topouzis F, Anastasopoulos E, Augood C, Bentham GC, Chakravarthy U, et al. (2009) Association of diabetes with age-related macular degeneration in the EUREYE study. *Br J Ophthalmol* 93: 1037–1041.
- Kahn HA, Leibowitz HM, Ganley JP, Kini MM, Colton T, et al. (1977) The Framingham Eye Study. II. Association of ophthalmic pathology with single variables previously measured in the Framingham Heart Study. *Am J Epidemiol* 106: 33–41.
- Beltrán-Sánchez H, Harhay MO, Harhay MM, McElligott S (2013) Prevalence and Trends of Metabolic Syndrome in the Adult U.S. Population, 1999–2010. *J Am Coll Cardiol* 62: 697–703.
- Hyman LG, Lillienfeld AM, Ferris FL 3rd, Fine SL (1983) Senile macular degeneration: a case-control study. *Am J Epidemiol* 118: 213–227.

9. Vernay M, Salanave B, Peretti C, Druet C, Malon A, et al. (2013) Metabolic syndrome and socioeconomic status in France: The French Nutrition and Health Survey (ENNS, 2006–2007). *Int J Public Health* 58: 855–864.
10. Reaven G (2005) Insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease: the end of the beginning. *Circulation* 112: 3030–3032.
11. Chiu CJ, Taylor A (2011) Dietary hyperglycemia, glycemic index and metabolic retinal diseases. *Progr Retin Eye Res* 30: 18–53.
12. Luty GA (2013) Effects of Diabetes on the Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: ORSF81–ORSF87.
13. Rees DA, Alcolado JC (2005) Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med* 22: 359–370.
14. Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K (2010) Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299: E685–E694.
15. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, et al. (2000) Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 321: 405–412.
16. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ (2002) Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr* 76: 911–922.
17. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, et al. (2009) Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* 119: 1322–1334.
18. Tappy L, Le KA (2010) Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev* 90: 23–46.
19. Jurgens H, Haass W, Castaneda TR, Schurmann A, Koebnick C, et al. (2005) Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obes Res* 13: 1146–1156.
20. Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R, et al. (2002) Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPARalpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1180–E1190.
21. Grossniklaus HE, Kang SJ, Berglin L (2010) Animal models of choroidal and retinal neovascularization. *Prog Retin Eye Res* 29: 500–519.
22. Jaissle GB, May CA, Reinhard J, Kohler K, Fauser S, et al. (2001) Evaluation of the rhodopsin knockout mouse as a model of pure cone function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 506–513.
23. Breillon L, Acar N, Seeliger MW, Santos M, Maire MA, et al. (2008) ApoB₁₀₀ LDLR^{-/-} Mice Exhibit Reduced Electroretinographic Response and Cholesteryl Esters Deposits in the Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 1307–1314.
24. Fourgeux C, Martine L, Acar N, Bron AM, Creuzot-Garcher CP, et al. (2014) In vivo consequences of cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) inhibition by voriconazole on cholesterol homeostasis and function in the rat retina. *Biochem Biophys Res Commun* 446: 775–781.
25. Hancock HA, Kraft TW (2004) Oscillatory Potential Analysis and ERGs of Normal and Diabetic Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 1002–1008.
26. Tinsley FC, Taicher GZ, Heiman ML (2004) Evaluation of a quantitative magnetic resonance method for mouse whole body composition analysis. *Obes Res* 12: 150–160.
27. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497–509.
28. Morrison WL, Smith LM (1964) Preparation of fatty acids methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride methanol. *J Lipid Res* 5: 600–608.
29. Ackman RG (1981) Flame ionization detection applied to thin-layer chromatography on coated quartz rods. *Methods Enzymol* 72: 205–252.
30. Breillon L, Thuret G, Grégoire S, Acar N, Joffre C, et al. (2008) Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and lacrimal gland, and associations with adipose tissue fatty acids in human subjects. *Exp Eye Res* 87: 521–528.
31. Sebedio JL, Astorg PO, Septier C, Grandgirard A (1987) Quantitative analyses of polar components in frying oils by the iatroscan thin-layer chromatography-flame ionization detection technique. *J Chromatogr* 405: 371–378.
32. Andreoli M, Illesca P, González M, Bernal C (2010) Conjugated Linoleic Acid Reduces Hepatic Steatosis and Restores Liver Triacylglycerol Secretion and the Fatty Acid Profile During Protein Repletion in Rats. *Lipids* 45: 1035–1045.
33. Wu X, Tong Y, Shankar K, Baumgardner JN, Kang J, et al. (2011) Lipid Fatty Acid Profile Analyses in Liver and Serum in Rats with Nonalcoholic Steatohepatitis Using Improved Gas Chromatography–Mass Spectrometry Methodology. *J Agric Food Chem* 59: 747–754.
34. Seeliger MW, Grimm C, Stahlberg F, Friedburg C, Jaissle G, et al. (2001) New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* 29: 70–74.
35. Robinson R, Barathi VA, Chaurasia SS, Wong TY, Kern TS (2012) Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals. *Dis Model Mech* 5: 444–456.
36. Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R (2013) Pathophysiology of Diabetic Retinopathy. *ISRN Ophthalmology* 2013: 343560.
37. Ferrannini E, Gastaldelli A, Iozzo P (2011) Pathophysiology of prediabetes. *Med Clin North Am* 95: 327–339, vii–viii.
38. Tobey TA, Mondon CE, Zavaroni I, Reaven GM (1982) Mechanism of insulin resistance in fructose-fed rats. *Metabolism* 31: 608–612.
39. Zavaroni I, Sander S, Scott S, Reaven GM (1980) Effect of fructose feeding on insulin secretion and insulin action in the rat. *Metabolism* 29: 970–973.
40. Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM (1987) Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 10: 512–516.
41. Maugeri A, Klevering BJ, Rohrschneider K, Blankenagel A, Brunner HG, et al. (2000) Mutations in the ABCA4 (ABCR) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy. *Am J Hum Genet* 67: 960–966.
42. Holopigian K, Greenstein VC, Seiple W, Hood DC, Carr RE (1997) Evidence for photoreceptor changes in patients with diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 2355–2365.
43. Park SH, Park JW, Park SJ, Kim KY, Chung JW, et al. (2003) Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia* 46: 1260–1268.
44. Wachtmeister L, Dowling JE (1978) The oscillatory potentials of the mudpuppy retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 1176–1188.
45. Aug MH, Kim MK, Olson DE, Thule PM, Pardue MT (2013) Early visual deficits in streptozotocin-induced diabetic long evans rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 1370–1377.
46. Bresnick GH, Korth K, Groo A, Palta M (1984) Electroretinographic oscillatory potentials predict progression of diabetic retinopathy. Preliminary report. *Arch Ophthalmol* 102: 1307–1311.
47. Juen S, Kieselbach GF (1990) Electrophysiological changes in juvenile diabetics without retinopathy. *Arch Ophthalmol* 108: 372–375.
48. Shirao Y, Kawasaki K (1998) Electrical responses from diabetic retina. *Progr Retin Eye Res* 17: 59–76.
49. Vadala M, Anastasi M, Lodato G, Cillino S (2002) Electroretinographic oscillatory potentials in insulin-dependent diabetes patients: A long-term follow-up. *Acta Ophthalmol Scand* 80: 305–309.
50. Lachapelle P, Benoit J, Little JM, Faubert J (1989) The diagnostic use of the second oscillatory potential in clinical electroretinography. *Doc Ophthalmol* 73: 327–336.
51. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, et al. (1998) Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281: 1683–1686.
52. Suganami E, Takagi H, Ohashi H, Suzuma K, Suzuma I, et al. (2004) Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization: possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells. *Diabetes* 53: 2443–2448.
53. Han MS, Jung DY, Morel C, Lakhani SA, Kim JK, et al. (2013) JNK Expression by Macrophages Promotes Obesity-Induced Insulin Resistance and Inflammation. *Science* 339: 218–222.
54. Du H, Sun X, Guma M, Luo J, Ouyang H, et al. (2013) JNK inhibition reduces apoptosis and neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 2377–2382.
55. Omarova S, Charvet CD, Reem RE, Mast N, Zheng W, et al. (2012) Abnormal vascularization in mouse retina with dysregulated retinal cholesterol homeostasis. *J Clin Invest* 122: 3012–3023.
56. Mishra S, Harris TB, Hue T, Miljkovic I, Satterfield S, et al. (2013) Hyperleptinemia, adiposity, and risk of metabolic syndrome in older adults. *J Nutr Metab* 2013: 327079.
57. Jesmin S, Akter S, Rahman MM, Islam MM, Islam AM, et al. (2013) Disruption of components of vascular endothelial growth factor angiogenic signalling system in metabolic syndrome. Findings from a study conducted in rural Bangladeshi women. *Thromb Haemost* 109: 696–705.
58. Hwang IS, Huang WC, Wu JN, Shian LR, Reaven GM (1989) Effect of fructose-induced hypertension on the renin-angiotensin-aldosterone system and atrial natriuretic factor. *Am J Hypertension* 2: 424–427.
59. Cruz-Guilloty F, Saeed AM, Duffort S, Cano M, Ebrahimi KB, et al. (2014) T Cells and Macrophages Responding to Oxidative Damage Cooperate in Pathogenesis of a Mouse Model of Age-Related Macular Degeneration. *PLoS ONE* 9: e88201.

III-Résultats et conclusions principales

Un régime enrichi à 60% de fructose à long terme chez le rat Brown Norway, a permis de mettre en évidence un tableau clinique caractéristique d'un syndrome métabolique. Nous avons mis en évidence tout d'abord une augmentation significative de masse grasse dès 1 mois de régime maintenue jusqu'à 6 mois de régime. Par ailleurs, les analyses plasmatiques ont décrit la mise en place d'une hyperleptinémie après un mois de régime, ainsi que d'une hyperinsulinémie dès 3 mois. Enfin hyperinsulinémie et hyperleptinémie ont été détectées à 6 mois. Les taux plasmatiques de HDL, LDL, cholestérol, tricylglycérols et fructosamine n'ont cependant pas été affectés par ce régime. D'autre part, ce régime enrichi en fructose, a conduit à l'installation d'une stéatose hépatique après 3 mois de régime.

Notre modèle visait dans un premier temps à étudier les conséquences néovasculaires d'un tel régime sur la rétine. Ainsi, ce modèle de syndrome métabolique associé à un modèle de néovascularisation choroïdienne induit par impacts laser, a permis de mettre en évidence, lors des angiographies, une augmentation exacerbée de la néovascularisation choroïdienne sous régime fructose après 1 et 3 mois de régime. Cette augmentation de la néovascularisation est cependant transitoire car absente après 6 mois de régime. Une analyse de l'expression des gènes dans la rétine, a révélé d'autre part, la surexpression de gènes impliqués notamment dans le métabolisme du diabète (*Irs1*, *Slc2a2*), dans le métabolisme lipidique (*ApoB*, *Cd36*, *Pltp*, *Lcat*) mais aussi la surexpression de facteurs pro-angiogéniques *Vegf-a* et *Leptine* sous régime fructose confirmant ainsi les données angiographiques. Des marquages CD68 sur rétines mises à plat ont également révélé une augmentation significative de la population de cellules microgliales et/ou macrophages, augmentation d'autant plus importante si le régime fructose était associé au modèle CNV.

D'autre part, nous souhaitons étudier l'effet de ce régime diabétogène sur d'éventuelles conséquences fonctionnelles dans la rétine. Ainsi, des analyses électrorétinographiques de type Flicker ont été réalisées et ont montré une diminution de la sensibilité des photorécepteurs de type bâtonnets après 6 mois de régime. De même, l'étude des potentiels oscillatoires a révélé une diminution du 2^{ème} potentiel oscillatoire après 6 mois de régime suggérant une atteinte des cellules bipolaires et amacrines.

Ces différentes données nous ont permis de caractériser l'existence d'un terrain favorable au développement de complications de type néovasculaires et fonctionnelles sous environnement diabétogène en conditions d'hyperinsulinémie ou d'hyperleptinémie. Cette étude nous a donc permis de valider de notre modèle animal pour l'étude de la rétine dans un contexte pathologique précoce.

Ayant caractérisé les différentes complications et altérations rétiniennes au sein de cet environnement diabétogène, il nous a paru intéressant d'étudier alors, l'effet d'une supplémentation en AGPI-LC de type oméga 3. Ceci dans le but d'envisager un éventuel effet préventif des oméga 3 EPA et DHA dans ce type de pathologies rétiniennes.

Chapitre 4

Modulation de la réponse de la rétine par une approche nutritionnelle à base d'acide gras polyinsaturés à longue chaîne de type oméga 3 dans le cadre d'un syndrome métabolique

I-Problématique

A ce jour, malgré la nette avancée des traitements permettant de lutter contre les pathologies oculaires DMLA et RD, aucun véritable traitement curatif ne permet de soigner ces pathologies une fois qu'elles sont installées. La logique d'une prévention par l'alimentation apparaît intéressante. Il semblerait que les acides gras oméga 3 et notamment le DHA, dont les propriétés anti-inflammatoires et neuroprotectrices ont été largement décrites (SanGiovanni and Chew, 2005), pourraient prévenir d'une part l'évolution de la DMLA vers ses formes les plus avancées (Seddon et al., 2006) (SanGiovanni et al., 2007). Il préviendrait d'autre part de l'apparition du syndrome métabolique et en particulier de l'insulinorésistance facteur de risque principal de la RD (Paniagua et al., 2011). Plusieurs études épidémiologiques tendent de même à prouver que le développement et la progression de la DMLA serait réduits chez les patients disposant d'un régime alimentaire riche en acides gras oméga 3 et en particulier en poisson gras (Chong et al., 2009) (Christen et al., 2011).

Face à ces données, nous avons émis l'hypothèse que l'enrichissement du régime alimentaire avec des acides gras polyinsaturés à longue chaîne de type oméga 3 serait susceptible dans un premier temps d'améliorer les paramètres physiologiques d'un syndrome métabolique. Dans un second temps, il permettrait de prévenir l'apparition d'altérations fonctionnelles et de complications néovasculaires dans la rétine.

Afin de vérifier l'effet préventif d'une supplémentation en AGPI-LC oméga 3 dans le cadre d'un syndrome métabolique, nous avons soumis des rats Brown Norway soit à un régime standard, soit un régime enrichi à 60% de fructose, soit un régime standard supplémenté en oméga 3 (EPA : 10,9%, DHA 7,2% des acides gras totaux), soit à un régime fructose supplémenté en oméga 3 (EPA : 10,9%, DHA 7,2% des acides gras totaux).

Cette étude a considéré différentes durées de régime de 15 jours, 21 jours, 1mois, 3mois. L'effet de ces régimes a été testé d'un point de vue physiologique afin d'évaluer, l'effet d'une telle supplémentation sur les paramètres plasmatiques, sur l'évolution de la masse grasse et sur la stéatose hépatique.

Par ailleurs, l'incorporation des AGPI-LC de type oméga 3 a été vérifiée au niveau des structures cérébrales, rétiniennes et hépatiques. Enfin les conséquences fonctionnelles et néovasculaires ont été évaluées dans la rétine.

Les résultats de cette étude feront l'objet d'une publication soumise dans le journal PLOS Biology.

II-Article

Long chain omega 3 fatty acids promote retinal atrophy in the rat with metabolic syndrome

Magalie THIERRY^{1,2,3}, Bruno PASQUIS^{1,2,3}, Stéphane GREGOIRE^{1,2,3}, Valérie FEBVRET^{1,2,3}, Ségolène GAMBERT-NICOT^{1,2,3,4}, Jean-Christophe RAMEL⁵, Laurent LECLERE^{1,2,3}, Niyazi ACAR^{1,2,3}, Alain M. BRON^{1,2,3,5}, Catherine P. CREUZOT-GARCHER^{1,2,3,5}, Lionel BRETILLON^{1,2,3}

1 INRA, UMR1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Eye and Nutrition Research Group, F-21000 Dijon, France

2 CNRS, UMR6265 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France

3 Université de Bourgogne, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France

4 University Hospital, Department of Clinical Chemistry, F-21000 Dijon, France

5 University Hospital, Department of Ophthalmology, F-21000 Dijon, France

Key words: metabolic syndrome, retina, fatty acid, omega 3, neovascularization

Corresponding author: Lionel Bretillon, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR1324 INRA, 6265 CNRS, Université de Bourgogne, Centre INRA, 17 rue Sully, BP86510, 21065 Dijon cedex, Phone : +33.(0)3.80.69.31.21, lionel.bretillon@dijon.inra.fr

Abstract

Metabolic syndrome (MetS) is one of the most prevalent living- and diet-related disorder in the Western populations. It originates from inadequate dietary intakes and low energy expenditures. MetS is a major risk factor for type 2 diabetes that is further characterized by microvascular complications, especially in the retina. We previously published that MetS is a favorable environment for the development of neovascularization in the retina. The daily intake of 500mg of long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (omega-3s) is now recommended by health agencies for the prevention of MetS. Meanwhile dietary omega-3s are associated with reduced risk of neovascularization in Age-related Macular Degeneration (AMD), the leading cause of visual loss after the age of 50 years in developed countries. We therefore addressed the question of whether a supplementation with omega-3s would lower the development of choroidal neovascularization in the context of MetS.

We used a model of MetS in the rat fed with high fructose and supplemented with omega-3s during 3 months. The rats were submitted to laser photocoagulation in the eye fundus to trigger choroidal neovascularization after 1 and 3 months of fructose feeding. Angiography was monitored by confocal scanning laser ophthalmoscopy, and spectral domain optical coherence tomography. We showed that dietary omega-3s marginally improved MetS by reducing hepatic steatosis and hyperleptinemia at short term, but induced retinal atrophy thereafter. In parallel we also reported partial loss of sensitivity to light stimulus of cone photoreceptors in rats fed with omega-3s.

Despite the known positive effects of omega-3s on aging of the central nervous system including the retina, we reported adverse effects in the retina in the context of MetS. Accounting the prevalence of MetS and AMD that is correlative to the improvement of life expectancy, our findings would suggest to cautiously recommend the supplementation with omega 3s of aged subjects with MetS.

Author Summary

Metabolic syndrome is a cluster of physiological disorders affecting more and more people worldwide. It is a major risk factor for the development of type 2 diabetes and its complications, especially in the retina. In a previous work, we showed in a rat model of metabolic syndrome that a pro-diabetogenic high-fructose diet favors the development of retinal alterations, especially neovascularization. Numerous protective effects of fish oil and omega 3 fatty acids omega 3 EPA and DHA have been reported against metabolic syndrome and in the prevention of retinal pathologies. In this study we aimed to evaluate whether omega 3 fatty acids would lower the development of retinal complications in the context of metabolic syndrome in the rat. Unexpectedly, although omega 3 fatty acids improved marginally the parameters of metabolic syndrome at short term, omega 3 fatty acids induced alterations and atrophy of the retina in our model.

Blurb

A study revealing deleterious effects of long chain omega 3 fatty acids in the retina in the context of metabolic syndrome induced by feeding rats with fructose.

1. Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is associated to inadequate living and dietary habits, including disbalanced dietary intakes and low energy expenditure. MetS is one of the major risk factor for type 2 diabetes (T2D). As initially suggested by G.M. Reaven in the early 1990's, the clinical and biochemical features of MetS include dyslipidemia, impaired insulin sensitivity, glucose intolerance, abdominal adiposity and hypertension [1]. According to the National Health And Nutritional Examination Survey between 2003 and 2006, the prevalence of MetS reached 34% of the US population among subjects above the age of 20 years [2]. Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of visual loss in Western populations after the age of 50 years [3]. AMD is classified into its early phase called Age-Related Maculopathy and late stages: geographic atrophy (GA) or neovascular AMD (nvAMD). nvAMD is characterized by the development of neovascularization in the retina from the vascular choroid.

Whether diabetes is a risk factor for AMD remains controversial. A systematic review and meta-analysis was recently published by Chen et al. to examine this association. The analysis of data from 1,858,350 participants in 27 populations suggested that diabetes is a risk factor for AMD. Except cohort studies that did not find specific associations with any sub-type of AMD, the meta-analysis of cross-sectional and case-control studies revealed positive association with nvAMD (OR=1.48, 95% CI=1.44-1.51 for cross sectional studies ; OR=1.15, 95% CI=1.11-1.21 for case-control studies) but not for early AMD or GA [4].

Eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are the main long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) of the omega-3 series and are abundant in fatty fishes. Acting as natural hypolipidemic and anti-inflammatory agents, they may ameliorate various aspects of MetS [5]. Several animal and human data suggested potential implications of omega-3 fatty acids for obesity management [6]. In addition, by enhancing fatty acid oxidation and reducing de novo lipogenesis, omega-3 LC-PUFA would also reduce hepatosteatosis and preserve hepatic insulin sensitivity [7,8]. Several lines of evidence highlight that omega-3 LC-PUFA would be beneficial against oxidative stress and inflammation surrounding DR [9] or AMD [10]. Omega 3 LC-PUFA were specifically associated with the prevention of neovascularization [11-13].

The daily intake of 500mg of omega 3 LC-PUFA in adults is now recommended by health agencies for the prevention of obesity, diabetes and also AMD.

Feeding rodents with a high fructose diet is widely used to trigger insulin resistance and MetS [14,15]. Using this fructose fed rat model of MetS, we showed a significant increase of choroidal neovascularization as well as induction of pro angiogenic factors such as VEGF and leptin in the retina [16]. This finding suggested that MetS would represent a favorable environment for the development of neovascular complications in the retina.

Accounting the protective effects of omega 3 LC-PUFA against MetS in the one hand and prevention of choroidal neovascularization in the other hand, we questioned whether a dietary supplementation with omega 3 LC-PUFA may prevent retinal neovascular complications in a rat model of MetS.

2. Materials and methods

a. Ethical concerns

All procedures were conducted in accordance with the statements of the Association for Research in Vision and Ophthalmology for the use of animals in ophthalmic and vision research and were approved on April 4th 2013 (reference nr 0813) by the local Animal Care and Use Committee (Comité d’Ethique de l’Expérimentation Animale nr 105, Dijon, France). Personal (nr 21CAE095) and institutional (nr B21231010EA) agreements were obtained according to French regulations.

b. Experimental Diets

Four diets were used in this study: a standard diet (S), a fructose enriched diet (F), a standard + omega 3 diet (S ω 3) and a fructose enriched diet + omega 3 (F ω 3). The contents in fatty acids of the diets were selected according to previous experiments lead in our laboratory [17] and were purchased from Sniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Germany) (Table 1).

c. Animals

Male Brown Norway rats (Charles River; L’Arbresle, France), 6 wk old, weighing approximately 150-200g were housed under controlled conditions of temperature ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) and humidity (55-60%), with a 12h light/12h dark cycle, with light intensity of 580 and 280 lux at the center of the room and inside the cage, respectively.

The animals were randomly assigned to either of the four experimental diets (S, F, S ω 3 or F ω 3) and were fed for 1 month (n=24 rats per diet), or 3 months (n=24 rats per diet). Rats had unrestricted access to food and deionized water.

d. Electroretinography

The ERG was recorded after 1 and 3 months of feeding, according to previously described procedures for scotopic single flash ERG (n=8 rats per diet and per time point) and 8.02Hz Flicker ERG (n=8 rats per diet and per time point) as previously described [16].

e. Argon laser induced CNV and retinal imaging

Choroidal neovascularization (CNV) was induced by laser-induced photocoagulation in 8 rats per diet in the groups of rats fed during 1 and 3 months. One week before the end of the dietary period, i.e. after 3 or 7 weeks of feeding, laser-induced CNV was induced following the procedure described previously [16].

f. Retinal and choroidal imaging

Retinal and choroidal angiography was evaluated by confocal scanning laser ophthalmoscopy (cSLO) as described previously [16].

Abnormal zones identified by cSLO angiography were further analyzed using spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT) (Spectralis, Heidelberg Engineering GmbH) as described [18]. The rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg.kg⁻¹, Imalgène 1000, Merial, Lyon, France) and xylazine (10 mg/kg, Rompun 2%, Bayer, Puteau, France). Pupils were dilated with 1% Tropicamide (Mydriaticum, Laboratoires Thea, Clermont-Ferrand, France). The animals were placed on a custom built platform and corneas were intensively hydrated all experiment long using saline solution. Sectorial B scans sections longitudinal and horizontal (superior, inferior, nasal, temporal) were realized. The B-scans was composed of 1536 A-scans and consisted of an average of 100 individual sweeps using automatic real-time eye tracking software to reduce speckle noise.

g. Body composition analysis

EchoMRI 900 consists in an in vivo evaluation of a Quantitative Magnetic Resonance Imaging System for the determination of Whole Body Composition. Scans were taken from animals fed during 1 and 3 months with the experimental diets as previously described [16].

h. Collection of samples

The animals were fasted for 7 h and deeply anesthetized with pentobarbital (CEVA santé animale, Libourne, France). Blood was collected from the abdominal artery in EDTA-tubes. Plasma was prepared by centrifugation (20 min, 3000 rpm). Rats were euthanized by exsanguination, retina, brain and liver were collected from the groups of rats submitted to ERG evaluation and stored at -80°C until lipid and fatty acid analyses (n=16 per diet and per time point). Eyes from the groups of rats with CNV (n=8 per diet and per time point) were collected, oriented and stored at -80°C in OCT compound (Tissue-Tek®, Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, NL) until cryosections.

i. Cryosections

Cryosections (7 µm thick) were performed with a cryomicrotome (CM3050S, Leica, Microsystem SAS, Rueil-Malmaison, France) and collected on gelatin coated slides. Slides were stored at -80°C until further analysis. A haematoxylin counterstaining was then

performed on cryosections. Slides were first dipped in a haematoxylin solution (Haematoxylin stabilized solution, RAL, Martillac, France) during 50 s, then rinsed in milliQ water once and in tap water (alkaline water) three times. After drying, slides were dipped in xylene (Xylène, Labonord, Templemars, France) and coverslipped in mounting medium (Eukitt, O.Kindler GmbH & CO, Freiburg, Germany). Eye sections were visualized under bright light (Nikon-E600 microscope, Champigny-sur-Marne, France).

j. Lipid analyses

Lipids were extracted from the liver and neurosensory retina according to the Folch method [19]. Lipids from neurosensory retina and liver were transmethylated using boron trifluoride in methanol according to Morrison and Smith [20]. Fatty acid methyl esters were subsequently extracted with hexane and analyzed using gas chromatography on a Hewlett Packard Model 5890 gas chromatograph (Palo Alto, CA, USA) using a CPSIL-88 column (100 m×0.25 mm i.d., film thickness 0.20 µm; Varian, Les Ulis, France) equipped with a flame ionization detector. Hydrogen was used as the carrier gas (inlet pressure, 210 kPa). The oven temperature was held at 60°C for 5 min, increased to 165°C at 15°C/min and held for 1 min, and then to 225°C at 2°C/min and finally held at 225°C for 17 min. The injector and the detector were maintained at 250°C. Fatty acid methyl esters were identified by comparison with commercial standards (Sigma Aldrich, L'Isle d'Abeau, France). The data were processed using the EZChrom Elite software (Agilent Technologies, Massy, France) and reported as a percentage of the total fatty acids, after taking into account the coefficients of response of the detector over the main 36 fatty acids (from lauric acid to DHA).

The distribution of lipids into phospholipids, triacylglycerols, free fatty acids, free cholesterol and cholesteryl esters in the neural retina (n=8 per group) was determined using a combination of thin layer chromatography on silica gel-coated quartz rods and flame ionization detection (Iatroscan® system, Iatron, Tokyo, Japan), according to Ackman's technique [21] and published by our group [22]. The values obtained for each compound were corrected according to their response factor using specific calibration curves, as previously published [23]. Data were reported as a percentage of total lipids in the sample.

k. Plasma analyses

Glycaemia was evaluated using a blood glucose system (One Touch Ultra, Lifescan). Cholesterol, triacylglycerol, HDL, LDL, fructosamine were quantified by standard automatic

analyzers at the Clinical Chemistry Department of the University Hospital (Dijon, France). Plasma insulin, leptin levels were quantified on a 96-well plate using Rat Metabolic Magnetic Bead Panel and assessed by Luminex technology (Biorad Bioplex®200 system, Life sciences, Marnes-la-coquette). The analyses were performed according to the manufacturer protocols (Milliplex kit, Merck Millipore).

1. Statistical analyses

All analyses were conducted using GraphPad Prism software version 5.0. The level of statistical significance was set at $p \leq 0.05$ (*) and 0.01 (†), the tests were two-tailed. A nonparametric Kruskal–Wallis test was used to compare body fat, circulating insulin and leptin levels, fatty acids, lipid classes in the liver and quantification of CNV in the standard, fructose, standard omega 3 and fructose omega 3 groups.

3. Results

Effects of omega 3 LC-PUFA supplementation on body fat

Accounting the ability of fructose diet to enhance metabolic syndrome in a rodent model in the one hand [16,24], and the potential effects of omega 3 in obesity management in the other hand [25], body fat was analyzed after 1 and 3 months of feeding (Fig 1A and 1B). As expected, fructose-fed rats showed a significant increase of body fat ($p \leq 0.05$). Unexpectedly rats fed with omega 3 enriched diets (S ω 3 and F ω 3) showed increased body fat after 3 months of feeding compared to rats fed with the standard diet ($p \leq 0.05$).

Omega 3 LC-PUFA supplementation did not improve plasma parameters

Among plasma parameters, hyperinsulinemia was reported after 1 and 3 months in fructose fed animals compared to rats fed with the standard diet ($p \leq 0.05$). Nevertheless insulinemia was not improved by omega 3 supplementation (Fig 2A and 2B). Leptinemia was unmodified after 1 month but reduced in standard + omega 3 fed rats after 3 months of feeding (≤ 0.05) (Fig 3B).

Omega 3 LC-PUFA ameliorated liver steatosis in fructose-fed rats

Fructose induced a significant increase of liver weight and hepatic triacylglycerols after 3 months of feeding ($p \leq 0.05$), suggesting hepatomegaly. Interestingly, omega 3 supplementation reversed these effects (Fig 4A and 4B).

Analysis of fatty acids in the liver showed a massive incorporation of EPA and DHA (Fig 4C). Surprisingly, incorporation of DHA in the liver was higher in fructose+omega 3 rats than in standard+omega 3 rats ($p \leq 0.01$), whereas the inverse was observed with EPA ($p \leq 0.05$).

Omega 3 LC-PUFA incorporation in the retina

A significant increase in EPA and DHA was observed in rats after 1 and 3 months ($p \leq 0.05$, Figure 5). EPA levels in the retina of fructose + omega 3 fed rats remained significantly higher than in standard+omega 3 fed rats ($p \leq 0.05$, Figure 5).

Omega 3 LC-PUFA supplementation induced retinal and REP atrophy in a CNV model

Representative images of retinal and choroidal angiography extracted from cSLO after 1 month of feeding are presented in Fig 6A. Quantification of neovascularization of CNV after 1 month of feeding is presented in Fig 6B. As expected, and previously reported [16], fructose-fed rats developed significant exacerbated neovascularization 2 and 3 weeks after laser induced CNV. Omega 3 fed rats (S ω 3 and F ω 3) showed similar CNV to standard rats 2 weeks after laser injury (Figure 6B1). Nevertheless, CNV increased at similar levels to fructose fed rats in standard+omega 3 and fructose+omega 3 fed rats 3 weeks after laser injury (Figure 6B2).

After a period of 3 months of feeding with omega 3 LC-PUFA, cSLO images showed abnormal eye fundi in fructose+omega 3 and standard+omega 3 fed animals (Figure 7). SD-OCT images suggested reduced retinal thickness (Figure 8). Associated to an haematoxylin counterstaining of ocular sections from the eye observed by SD-OCT, we identified an exacerbated atrophy of the outer nuclear layer (ONL) and the retinal pigmentary epithelium (RPE) in fructose+omega 3 and standard+omega 3 rats (Fig 8B and C).

Omega 3 LC-PUFA supplementation altered sensitivity of cone photoreceptors and functionalities of the inner retina

8.02Hz ERG showed a shift to the right of cone peak of fructose+omega 3 and standard+omega 3 fed rats after 1 and 3 months ($\Delta = 0.5$ log, Figure 9), highlighting a decrease of sensitivity of cone photoreceptor to light stimulus.

4. Discussion

MetS is considered as a major public major public health issue and an important contributor to the global burden of chronic disease and disability. In our previous study, we showed that

MetS favored retinal complications, including neovascularization [16]. Omega 3 LC-PUFA have been reported to improve several parameters of metabolic syndrome such as insulin sensitivity, glucose metabolism [26], hypertriglyceridemia [27], inflammation [28], endothelial function [29]. In addition, omega 3 LC-PUFA have shown protective effects against retinal neovascularization [12].

Accounting to these effects, we hypothesized that omega 3 LC-PUFA would reduced CNV in our model of MetS.

We reported no positive effects of omega 3 LC-PUFA on plasma glucose, triacylglycerols, fructosamine, and HDL- and LDL-cholesterol levels as shown by others [30]. The lack of effects of omega 3 LC-PUFA on insulinemia is consistent with data from a recent study in patients with metabolic syndrome [27]. The decrease of leptinemia in standard + omega 3 fed rats is consistent with a study indicating a decrease of leptinemia in non obese patients supplemented with omega 3 [6].

Surprisingly, we observed an increase of body fat in fructose fed rats after 1 and 3 months of feeding which was also shown in omega 3 supplemented rats (S ω 3, F ω 3). These results differed from studies in this field which usually reported an improvement of BMI in patients fed with fish or fish oil without changes in body fat [31].

Interestingly, liver steatosis seemed to be positively affected by this supplementation. This is consistent with a recent study that reported anti-steatotic effect of omega 3 from fish in obese mice [32], and in fructose fed rats [33].

The primary aim of our study was to investigate whether Omega 3 EPA and DHA supplementation would reduce the development of CNV. Laser photocoagulation was used to trigger neovascularization, as used by others [34]. Laser spots create damage in the Bruch membrane that favors endothelial cells, pericytes, and inflammatory cells entering the RPE and sub-retinal space and forming CNV [34]. As indicated previously [16] and confirmed in the present study, a 1 month period of fructose feeding was associated with an exacerbated development of CNV. Two weeks after laser induced CNV, we observed a transient but significant reduction of neovascularization in fructose+omega 3 fed rats. However, this improvement did not persist later on since CNV was exacerbated in omega 3 supplemented rats. Unexpectedly, omega 3 supplementation induced atrophy of the RPE and the outer nuclear layer. Only few data described such deleterious effects of omega 3. A previous report

published in 1996 suggested that dietary fish oil supplementation may be harmful for the microvasculature in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats, including pericyte loss and formation of acellular, occluded capillaries [35]. Consistent with our findings, metabolites of omega 3 LC-PUFA may increase retinal pathologic neovascularization in mouse [36]. We supposed oxidative stress and generation of corresponding end-products of omega 3 LC-PUFA to be involved in these side effects, as reviewed by Salomon and co-workers in retinal neovascularization [37]. The decrease of sensitivity of cone photoreceptors in rats supplemented with omega 3 LC-PUFA supported the deleterious effects of a massive supplementation with these fatty acids.

It is well accepted that inflammation and oxidative stress are involved in the initiation and evolution of the MetS features and in a context of diabetes [38-40]. Thus, we supposed that oxidative stress generated by MetS offered favorable conditions for pro oxidant and deleterious effects of omega 3. Further investigations are needed to characterize the retinal atrophy described here. We suggested that further potentiation of the oxidative damages might be result from an association with an acute light sensitivity in a context of omega 3 supplementation after laser induced CNV and should be investigated. Finally, it seems important to consider which contents of omega 3 should possibly efficient and sufficient to protect and not create physiological and retinal injuries.

5. Figure legends

Fig 1: Body fat was increased in fructose fed rats after 1 and 3 months of feeding and in omega 3 fed rats after 3 months of feeding

Body fat (expressed as % of body weight) was quantified by EchoMRI in the rat after 1 month (A) and 3 months (B) of feeding with either the standard (S), 60%-rich fructose (F) diet, standard omega 3 diet (S ω 3) or fructose omega 3 (F ω 3). * statistically different at $p \leq 0.05$ (Kruskal-Wallis test). The bottom and top of the box are the first and third quartiles, and the band inside the box is the median. The ends of the whiskers are 1 standard deviation above and below the mean of the data (n=8 rats per group).

Fig 2: Insulinemia was increased in fructose and fructose+omega 3 fed rats after 1 and 3 months of feeding

Plasma insulin (expressed in pg per mL of plasma) were quantified in the rat after 1 month (A) and 3 months (B) of feeding with either the standard (S) or 60%-rich fructose (F) diet standard omega 3 diet (S ω 3) or fructose omega 3 (F ω 3). * statistically different at $p \leq 0.05$ (Kruskal-Wallis test). Values are given as means \pm SD (n=8 rats per group)

Fig 3: Leptinemia was not affected by fructose and fructose+omega 3 diets but decreased in standard omega 3 fed rats after 3 months of feeding

Plasma leptin (expressed in pg per mL of plasma) were quantified in the rat after 1 month (A) and 3 months (B) of feeding with either the standard (S) or 60%-rich fructose (F) diet standard omega 3 diet (S ω 3) or fructose omega 3 (F ω 3). * statistically different at $p \leq 0.05$ (Kruskal-Wallis test). Values are given as means \pm SD (n=8 rats per group)

Fig 4: Effects of fructose and omega 3 LC-PUFA on hepatosteatosis and fatty acid profile

A: Fructose-induced hepatomegaly was prevented by omega 3 LC-PUFA after 3 months of feeding

Hepatomegaly was evaluated by measuring liver weight (g) * and † statistically different at $p \leq 0.05$ and 0.01, respectively (Kruskal-Wallis test). Values are given as means \pm SD (n=8 rats per group).

B: Fructose-induced hepatic steatosis was prevented by omega 3 LC-PUFA after 3 months of feeding

Hepatic steatosis was evaluated by measuring triacylglycerols in the liver (expressed in % of total lipids) after 3 months of feeding with either the standard (S), 60%-rich fructose (F) diet, standard omega 3 diet (S ω 3) or fructose omega 3 (F ω 3). * and † statistically different at $p \leq 0.05$ and 0.01, respectively (Kruskal-Wallis test). Values are given as means \pm SD (n=8 rats per group).

C: Contents of omega 3 LC-PUFA in the liver after 3 months of feeding

Contents of ALA (C18:3 n-3), EPA (C20:5 n-3), DPA (C22:5 n-3), DHA (C 22:6 n-3) were evaluated by GC fatty analysis. * and † statistically different at $p \leq 0.05$ and 0.01, respectively (Kruskal-Wallis test). Values are given as means \pm SD (n=8 rats per group).

Fig 5: Fatty acid contents of EPA and DHA in the retina after 1 and 3 months of feeding

Contents of EPA (C20:5 n-3) and DHA (C22:6 n-3) were evaluated by gas chromatography. * and † statistically different at $p \leq 0.05$ and 0.01, respectively (Kruskal-Wallis test). Values are given as means \pm SD (n=8 rats per group).

Fig 6: Laser-induced choroidal neovascularization (CNV) was enhanced in rats fed with a 60%-rich fructose diet but was only transiently prevented by omega 3 LC-PUFA after 1 month of feeding

A: Representative images of choroidal indocyanine green angiography and retinal fluorescein angiography taken 2 weeks post laser-induced CNV in rats fed with either the standard, 60%-rich fructose diet, standard omega 3 diet (S ω 3) or fructose omega 3 (F ω 3). Images were taken at 20° by confocal scanning laser ophthalmoscopy at 795 nm. CNV correspond to the filling of the new vessels by indocyanine green further to the breaks created by the laser spots (532 nm, 300 mW, 50 ms, 75 μ m) in the retinal pigment epithelium and Bruch's membrane.

B: Semi-quantification of CNV (ratio between the area of indocyanine green fluorescence and optic disc area) at 2 and 3 weeks after laser-induced CNV in the rat fed with either the standard (S) or 60%-rich fructose (F) diet, standard omega 3 diet (S ω 3) or fructose omega 3 (F ω 3). * statistically different at $p \leq 0.05$ (Kruskal-Wallis test). Values are given as individual data and means \pm SD (n=8 rats per group).

Fig 7: Three month-supplementations with omega 3 LC-PUFA were associated to retinal atrophy in laser-induced choroidal neovascularization (CNV) rats

Representative images of choroidal indocyanine green angiography and retinal fluorescein angiography taken 2 weeks post laser-induced CNV in rats fed with either the standard (S), 60%-rich fructose diet (F), standard omega 3 diet (S ω 3) or fructose omega 3 (F ω 3). Images were taken at 20° by confocal scanning laser ophthalmoscopy at 795 nm.

Fig 8: Visualisation of retinal atrophy by Spectral Domain Optical Coherence Tomography and haematoxylin counterstaining

Representative images of choroidal angiographies (1) associated to SD-OCT (2) using SD-OCT Spectralis, two weeks after laser induced CNV, in Fructose (A), Fructose+omega 3 (B) and Standard+omega 3 (C) fed rats, after three months of feeding. Eye cryosections of the corresponding eyes were performed after euthanasia with an haematoxylin counterstain (3).

Fig 9: Omega 3 LC-PUFA supplementation induced a decrease of sensitivity of cone photoreceptors after 1 and 3 months of feeding

8.02Hz Flicker electroretinographic data of S, F, S ω 3, F ω 3 fed rats at 1 (A) and 3 months (B). Black lines indicate maximal response of photoreceptors in standard fed rats (S), red lines indicates maximal response of photoreceptors in fructose fed rats (F). Green lines indicate maximal response of photoreceptors of standard + omega 3 fed rats (S ω 3). Orange lines indicate maximal response of photoreceptors of fructose + omega 3 fed rats (F ω 3). The first peak corresponds to maximal response of rods and the second peak to cones. (n=8 in each group).

6. References

1. Reaven GM (1993) Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu Rev Med* 44: 121-131.
2. Ervin RB (2009) Prevalence of metabolic syndrome among adults 20 years of age and over, by sex, age, race and ethnicity, and body mass index: United States, 2003-2006. *Natl Health Stat Report*: 1-7.
3. Klein R, Klein BEK (2013) The Prevalence of Age-Related Eye Diseases and Visual Impairment in Aging: Current Estimates. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: ORSF5-ORSF13.
4. Chen X, Rong SS, Xu Q, Tang FY, Liu Y, et al. (2014) Diabetes mellitus and risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 9: e108196.
5. Flachs P, Rossmeisl M, Bryhn M, Kopecky J (2009) Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. *Clin Sci (Lond)* 116: 1-16.
6. Gray B, Steyn F, Davies PS, Vitetta L (2013) Omega-3 fatty acids: a review of the effects on adiponectin and leptin and potential implications for obesity management. *Eur J Clin Nutr* 67: 1234-1242.
7. Sato A, Kawano H, Notsu T, Ohta M, Nakakuki M, et al. (2010) Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. *Diabetes* 59: 2495-2504.
8. Jump DB (2011) Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14: 115-120.
9. Kowluru RA, Zhong Q, Santos JM, Thandampallayam M, Putt D, et al. (2014) Beneficial effects of the nutritional supplements on the development of diabetic retinopathy. *Nutr Metab (Lond)* 11: 8.
10. Querques G, Souied EH (2014) The role of omega-3 and micronutrients in age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 59: 532-539.
11. Augood C, Chakravarthy U, Young I, Vioque J, de Jong PT, et al. (2008) Oily fish consumption, dietary docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid intakes, and

- associations with neovascular age-related macular degeneration. *Am J Clin Nutr* 88: 398-406.
12. Connor KM, SanGiovanni JP, Lofqvist C, Aderman CM, Chen J, et al. (2007) Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med* 13: 868-873.
 13. Moghaddam-Taaheri S, Agarwal M, Amaral J, Fedorova I, Agrón E, et al. (2011) Effects of Docosahexaenoic Acid in Preventing Experimental Choroidal Neovascularization in Rodents. *J Clin Exp Ophthalmol* 2.
 14. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, et al. (2006) A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F625-631.
 15. Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM (1987) Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 10: 512-516.
 16. Thierry M, Pasquis B, Acar N, Grégoire S, Febvret V, et al. (2014) Metabolic syndrome triggered by high-fructose diet favors choroidal neovascularization and impairs retinal light sensitivity in the rat. *PLoS ONE* 9: e112450.
 17. Schnebelen C, Grégoire S, Pasquis P, Joffre C, Creuzot-Garcher C, et al. (2009) Dietary n-3 and n-6 PUFA enhances DHA incorporation in retinal phospholipids without affecting PGE1 and PGE2 levels. *Lipids* 44: 465-470.
 18. Fortune B, Choe TE, Reynaud J, Hardin C, Cull GA, et al. (2011) Deformation of the rodent optic nerve head and peripapillary structures during acute intraocular pressure elevation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 6651-6661.
 19. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
 20. Morrison WL, Smith LM (1964) Preparation of fatty acids methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride methanol. *J Lipid Res* 5: 600-608.
 21. Ackman RG (1981) Flame ionization detection applied to thin-layer chromatography on coated quartz rods. *Methods Enzymol* 72: 205-252.
 22. Bretillon L, Thuret G, Grégoire S, Acar N, Joffre C, et al. (2008) Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and lacrimal gland, and associations with adipose tissue fatty acids in human subjects. *Exp Eye Res* 87: 521-528.

23. Sebedio JL, Astorg PO, Septier C, Grandgirard A (1987) Quantitative analyses of polar components in frying oils by the iatroskan thin-layer chromatography-flame ionization detection technique. *J Chromatogr* 405: 371-378.
24. Bocarsly ME, Powell ES, Avena NM, Hoebel BG (2010) High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacol Biochem Behav* 97: 101-106.
25. Li J, Li FR, Wei D, Jia W, Kang JX, et al. (2014) Endogenous omega-3 polyunsaturated fatty acid production confers resistance to obesity, dyslipidemia, and diabetes in mice. *Mol Endocrinol* 28: 1316-1328.
26. Flachs P, Rossmeisl M, Kopecky J (2014) The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Physiol Res* 63 Suppl 1: S93-118.
27. Oh PC, Koh KK, Sakuma I, Lim S, Lee Y, et al. (2014) Omega-3 fatty acid therapy dose-dependently and significantly decreased triglycerides and improved flow-mediated dilation, however, did not significantly improve insulin sensitivity in patients with hypertriglyceridemia. *Int J Cardiol* 176: 696-702.
28. Taltavull N, Munoz-Cortes M, Lluís L, Jove M, Fortuno A, et al. (2014) Eicosapentaenoic acid/docosahexaenoic acid 1:1 ratio improves histological alterations in obese rats with metabolic syndrome. *Lipids Health Dis* 13: 31.
29. Ahmadi A, Gharipour M, Arabzadeh G, Moin P, Hashemipour M, et al. (2014) The effects of vitamin E and omega-3 PUFAs on endothelial function among adolescents with metabolic syndrome. *Biomed Res Int* 2014: 906019.
30. Mamikutty N, Thent ZC, Sapri SR, Sahrudin NN, Mohd Yusof MR, et al. (2014) The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *Biomed Res Int* 2014: 263897.
31. Bender N, Portmann M, Heg Z, Hofmann K, Zwahlen M, et al. (2014) Fish or n3-PUFA intake and body composition: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 15: 657-665.
32. Rossmeisl M, Medrikova D, van Schothorst EM, Pavlisova J, Kuda O, et al. (2014) Omega-3 phospholipids from fish suppress hepatic steatosis by integrated inhibition of biosynthetic pathways in dietary obese mice. *Biochim Biophys Acta* 1841: 267-278.

33. Karsenty J, Landrier JF, Rousseau-Ralliard D, Robbez-Masson V, Margotat A, et al. (2013) Beneficial effects of omega-3 fatty acids on the consequences of a fructose diet are not mediated by PPAR delta or PGC1 alpha. *Eur J Nutr* 52: 1865-1874.
34. Grossniklaus HE, Kang SJ, Berglin L (2010) Animal models of choroidal and retinal neovascularization. *Prog Retin Eye Res* 29: 500-519.
35. Hammes HP, Weiss A, Fuhrer D, Kramer HJ, Papavassilis C, et al. (1996) Acceleration of experimental diabetic retinopathy in the rat by omega-3 fatty acids. *Diabetologia* 39: 251-255.
36. Shao Z, Fu Z, Stahl A, Joyal JS, Hatton C, et al. (2014) Cytochrome P450 2C8 omega3-long-chain polyunsaturated fatty acid metabolites increase mouse retinal pathologic neovascularization--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34: 581-586.
37. Salomon RG, Hong L, Hollyfield JG (2011) Discovery of carboxyethylpyrroles (CEPs): critical insights into AMD, autism, cancer, and wound healing from basic research on the chemistry of oxidized phospholipids. *Chem Res Toxicol* 24: 1803-1816.
38. Feillet-Coudray C, Fouret G, Ebabe Elle R, Rieusset J, Bonafos B, et al. (2014) The mitochondrial-targeted antioxidant MitoQ ameliorates metabolic syndrome features in obesogenic diet-fed rats better than Apocynin or Allopurinol. *Free Radic Res* 48: 1232-1246.
39. Yan LJ (2014) Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. *J Diabetes Res* 2014: 137919.
40. Giacco F, Brownlee M (2010) Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 107: 1058-1070.

7. Financial Disclosures

This work was supported by grants from Laboratoires Horus Pharma (Saint Laurent du Var, France) (partial funding of the research project, and PhD fellowship to MT) the Regional Council of Burgundy France (PARI Agrale 1, and PhD fellowship to MT), the FEDER (European Funding for Regional Economic Development), INRA, CNRS, Université de Bourgogne, and by a French Government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the “Investissements d’Avenir” program with reference ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC Labex. The funders had no role in study design, data collection and

analysis, interpretation of the results, decision to publish, or preparation of the manuscript. This does not alter our adherence to PLoS BIOLOGY policies on sharing data and materials.

8. Competing Interests

The authors declare the following financial competing interests in relation with the present work. MT is a recipient of Laboratoires Horus Pharma (Saint Laurent du Var, France) and Conseil Régional de Bourgogne (France) PhD fellowship. MT and LB received travel grants from Laboratoires Horus Pharma (Saint Laurent du Var, France) for attending annual ARVO meetings. None of these competing interests influenced reporting, handling, and review of the present paper.

Table 1

Fatty acids composition of dietary lipids

	oil mixture Standard and Fructose diets	oil mixture Standard omega 3 and Fructose omega 3 diets
C12:0	0,07	0,26
C14:0	0,41	6,27
C15:0	0,03	0,44
C16:0	19,45	24,96
C16:1 ω 9	0,03	0,32
C16:1 ω 7	0,14	6,37
C17:0	0,07	0,39
C18:0	3,35	4,23
C18:1t	ND	0,12
C18:1 ω 9	58,49	25,83
C18:1 ω 7	1,11	2,68
C18:2tc	0,12	ND
C18:2ct	0,13	ND
C18:2 ω 6	13,19	13,13
C18:3 ω 6	ND	0,12
C20:0	0,36	0,38
C20:1 ω 9	0,41	0,84
C20:1 ω 7	0,00	ND
C18:3 ω 3	1,71	0,58
iso C18:3	0,08	1,58
C18:4 ω 3	ND	ND
C20:4 ω 6	ND	0,46
C20:5 ω 3	ND	6,03
C20:2 ω 6	0,06	0,14
C22:0	0,47	0,28
C22:1 ω 9	0,09	0,45
C24:0	0,18	ND
C24:1 ω 9	0,04	0,21
C22:5 ω 6	ND	0,14
C22:5 ω 3	ND	0,58
C22:6 ω 3	ND	3,22
<i>total</i>	<i>99,99</i>	<i>100,01</i>
<i>saturated FA</i>	<i>24,39</i>	<i>37,21</i>
<i>monounsaturated FA</i>	<i>60,27</i>	<i>36,49</i>
<i>total ω6 FA</i>	<i>13,25</i>	<i>13,99</i>
<i>total ω3 FA</i>	<i>1,71</i>	<i>10,41</i>
<i>ω6 + ω3 FA</i>	<i>14,96</i>	<i>24,40</i>

Values are expressed in percentage of total fatty acids. ND: Not Detected (under the detection limit of gas chromatography, $p \leq 0.05$)

Figure 1

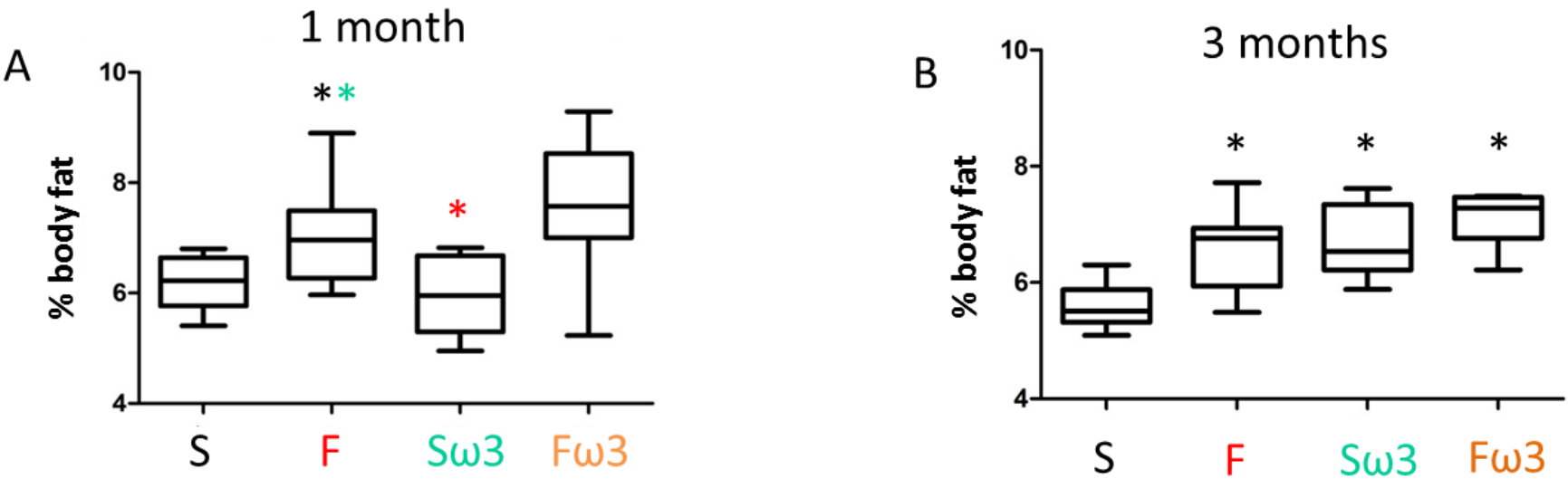


Figure 2

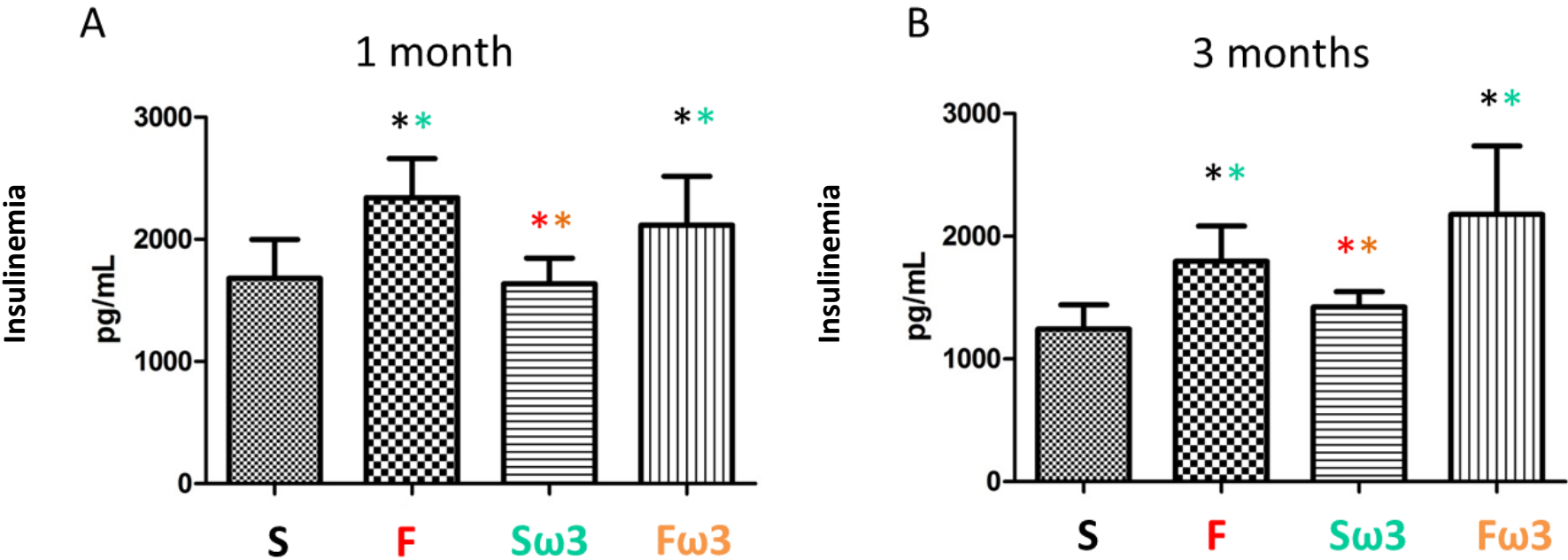


Figure 3

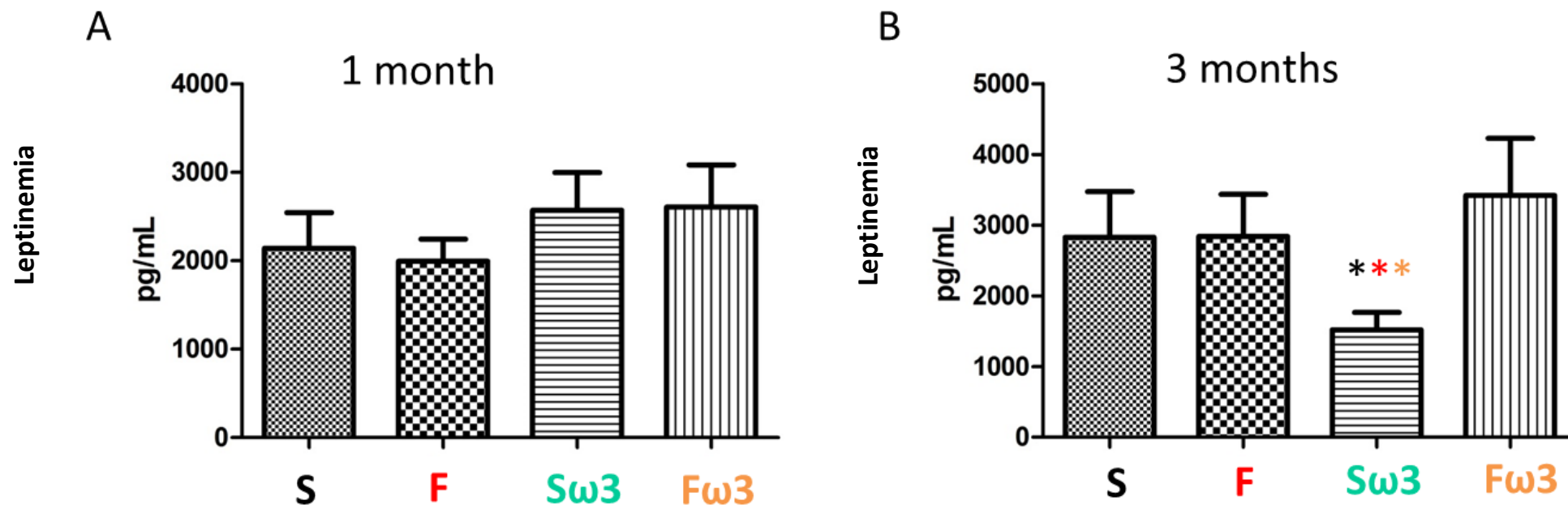


Figure 4

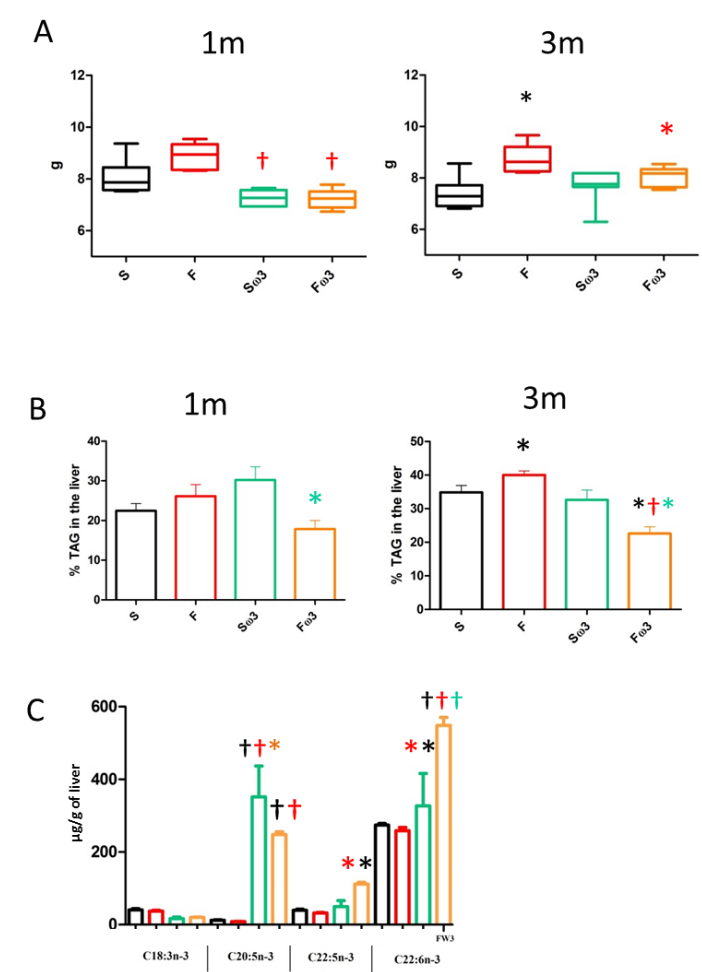


Figure 5

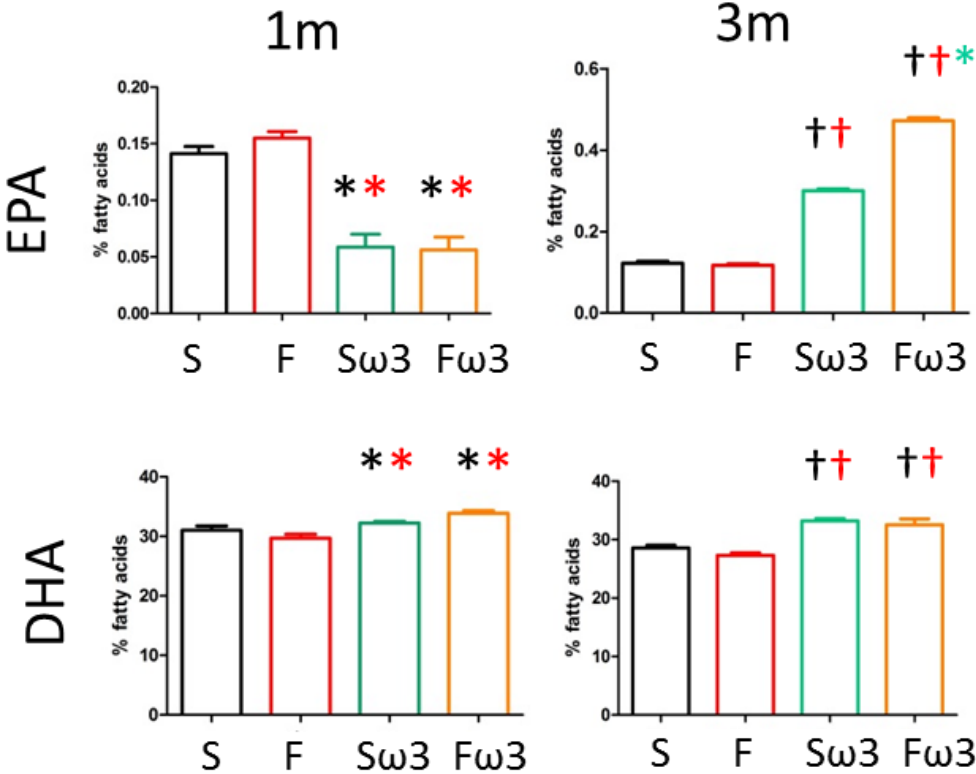


Figure 6

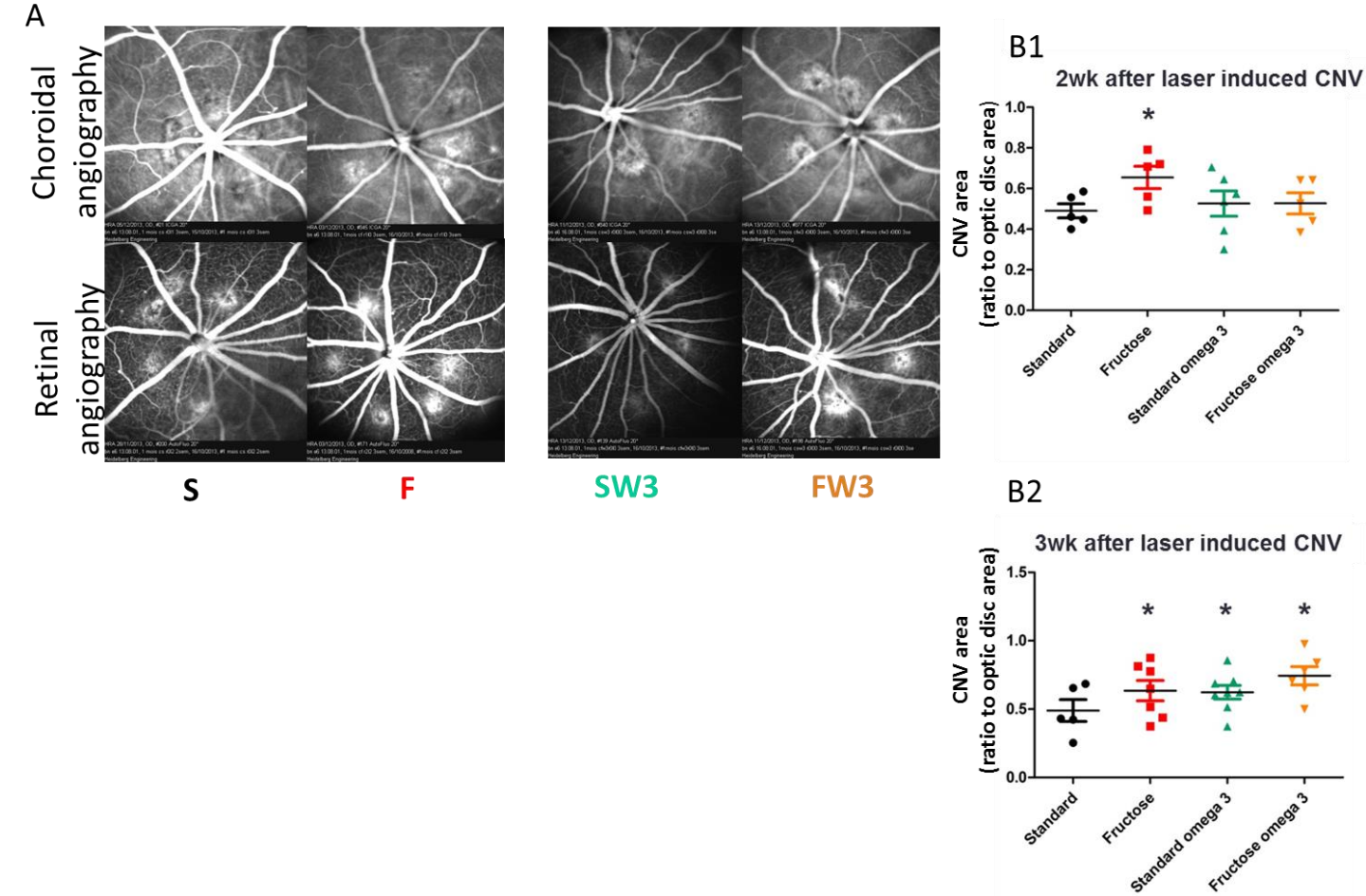


Figure 7

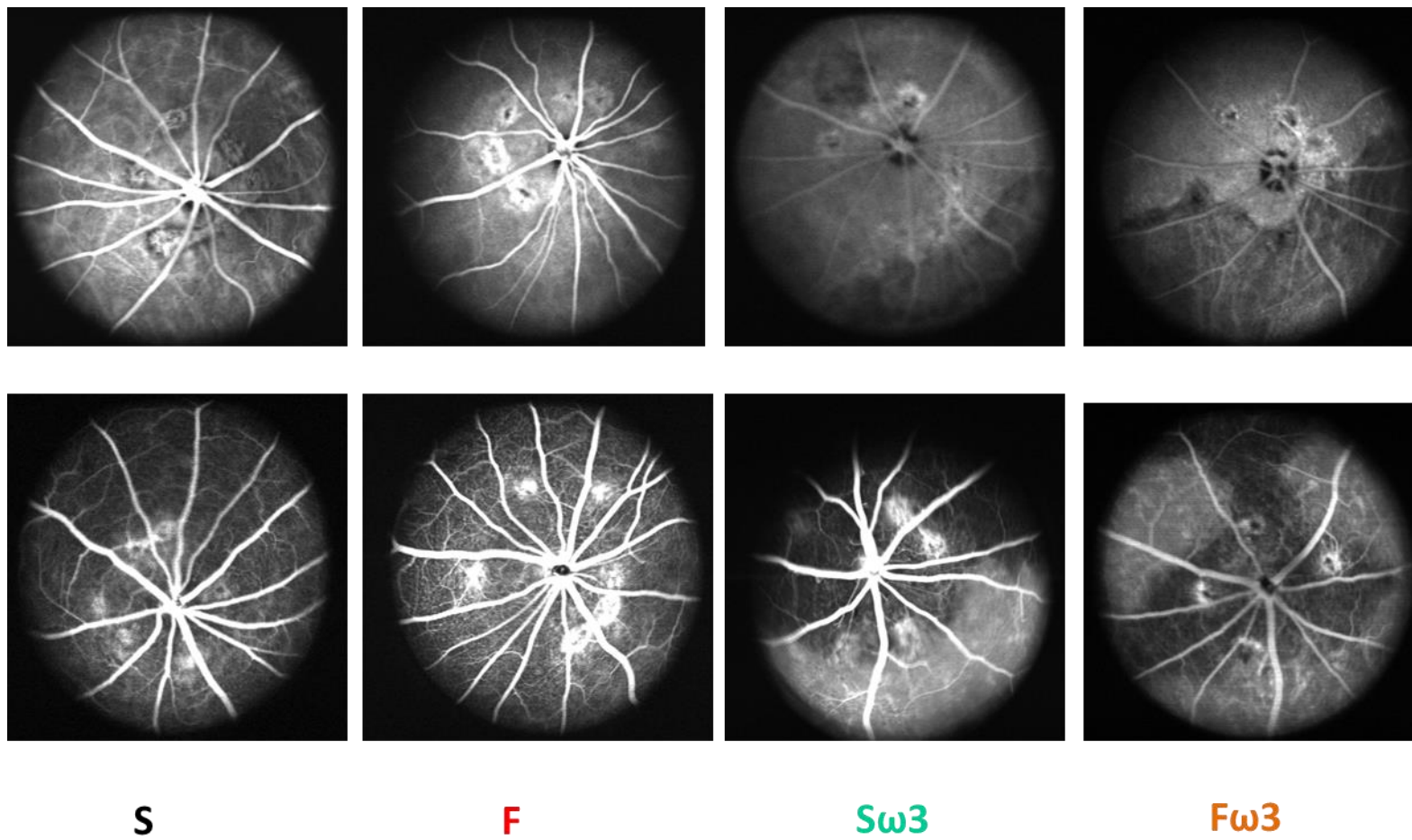


Figure 8

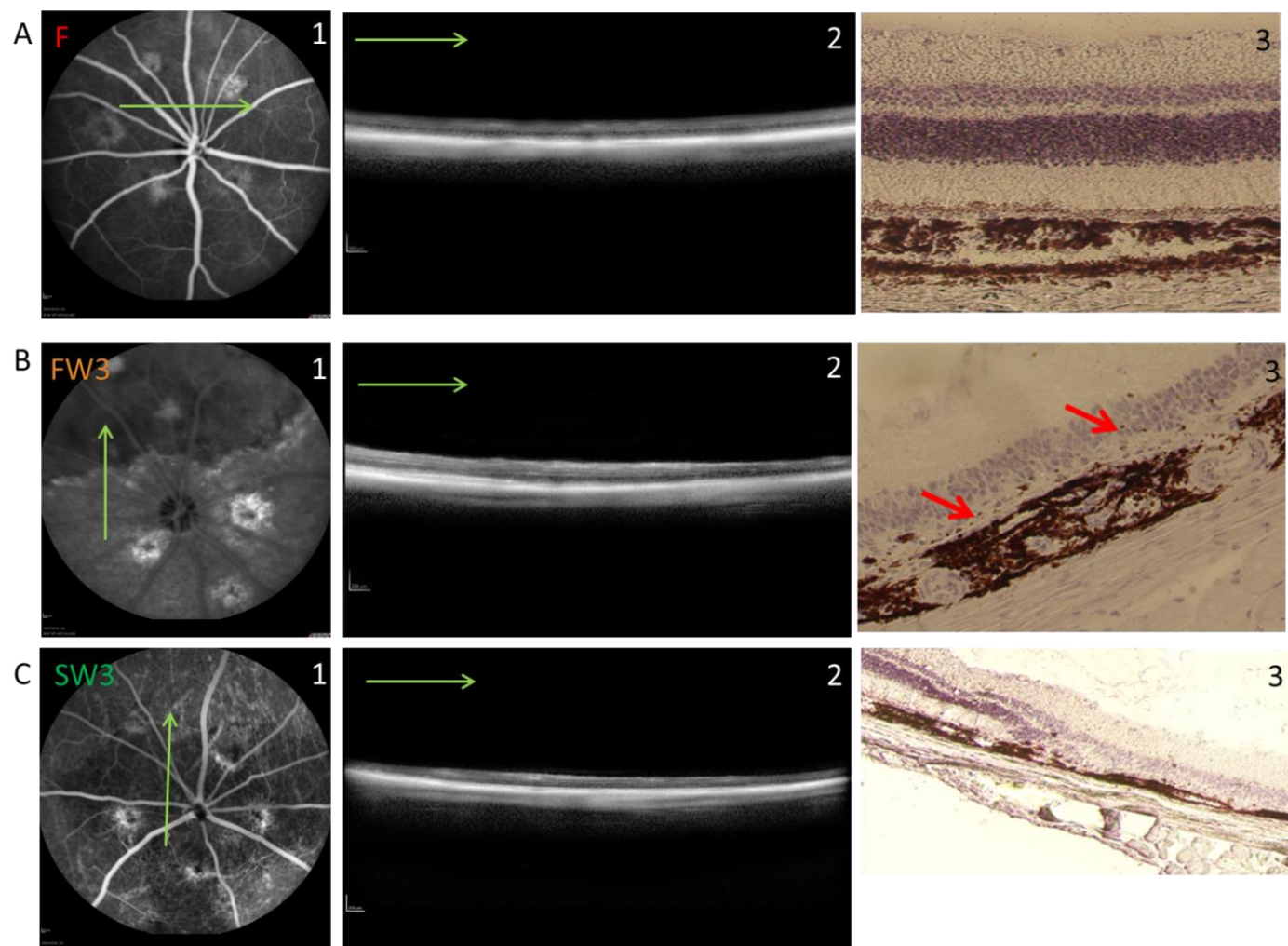
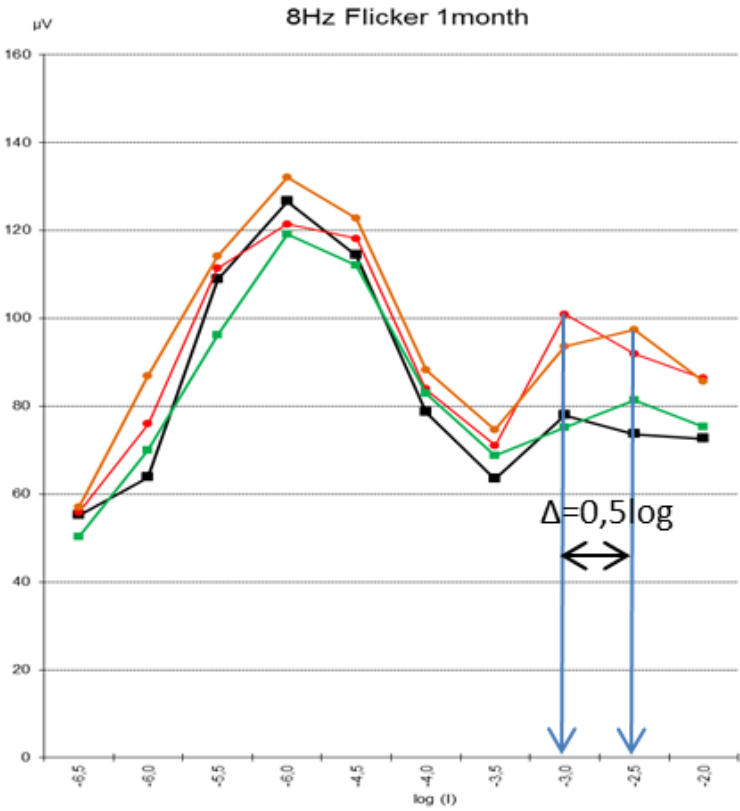
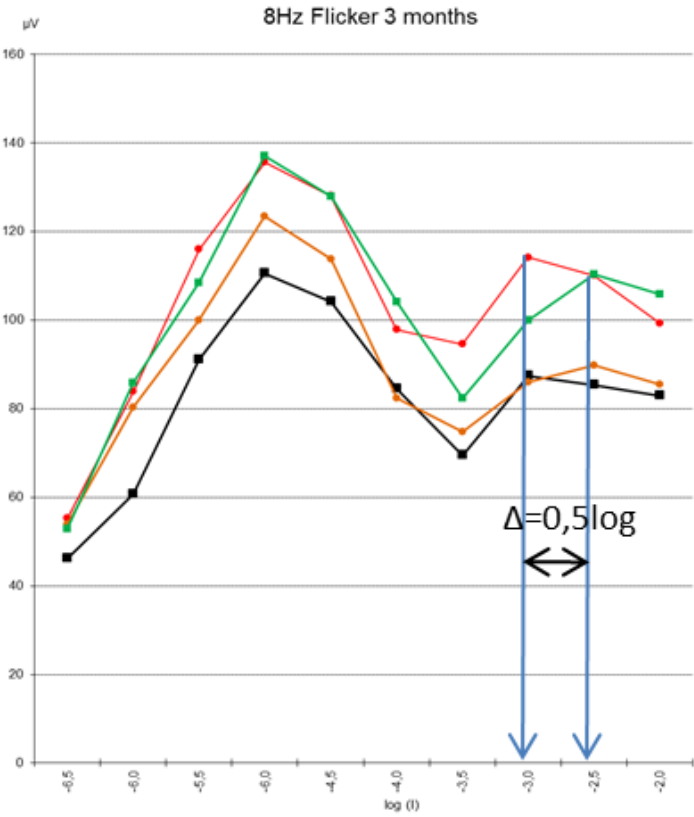


Figure 9

A



B



III-Résultats et conclusions principales

Les résultats obtenus dans nos études préalables ont permis de mettre en place un modèle animal de syndrome métabolique présentant un terrain favorable à l'installation de complications de type néovasculaires et d'altérations fonctionnelles dans la rétine. Cette dernière étude avait pour but de tester l'éventuel effet préventif d'AGPI-LC de type oméga 3 sur les conséquences rétinienne observées précédemment (perte de sensibilité des photorécepteurs et augmentation de la néovascularisation choroïdienne) ainsi que sur les conséquences physiologiques générées par ce régime pro-diabétoène.

Des rats Brown Norway ont reçu pendant différentes durées de 15 jours, 21 jours, 1 mois et 3 mois soit un régime standard, soit un régime fructose, soit un régime standard enrichi en oméga 3 EPA et DHA, soit un régime fructose enrichi en oméga 3 EPA et DHA.

Au niveau physiologique, l'hyperinsulinémie détectée dès 1 mois chez des rats soumis à un régime fructose n'est pas contrecarrée par l'apport d'oméga 3. De même la leptinémie n'a pas été affectée. Aucune modification des paramètres plasmatiques cholestérol, HDL, LDL, triacylglycérol et fructosamine n'a été détectée. Après 3 mois de régime, les animaux soumis aux régimes fructose, standard + oméga 3 et fructose + oméga 3 présentent une augmentation significative de masse grasse. Un effet significatif des oméga 3 est cependant observé sur la diminution de la stéatose hépatique induite par le régime fructose après 3 mois de régime.

Les analyses lipidiques menées sur les rétines et structures cérébrales ont montré une incorporation rapide de l'EPA et DHA dès quelques jours de régime, révélant une meilleure incorporation dans la rétine que dans le cerveau en particulier sous régime fructose + oméga 3.

Par ailleurs, les études menées sur le modèle CNV ont mis en évidence après 1 mois une diminution significative de la néovascularisation sous régime oméga 3 (comparé au régime fructose) mais qui reste cependant très transitoire. Après 3 mois de régime, les angiographies réalisées mettaient clairement en évidence des zones anormales chez tous les animaux soumis aux régimes oméga 3. Des analyses menées par Spectral Domain Optical Coherence Tomography et par la réalisation de colorations à l'haematoxyline sur cryosections ont alors

révélé une atrophie de la rétine sous régimes enrichis en oméga 3. Cette atrophie concerne en particulier la couche nucléaire externe et de l'EPR.

Les études électrorétinographiques menées au cours de notre étude à court terme avait montré une atteinte de la sensibilité des photorécepteurs de types cônes sous régime fructose dès 8 jours de régime. Ceci s'avère ici confirmé après 15 jours et 21 jours de régime. Cette perte est transitoire sous régime fructose mais reste cependant maintenue en présence d'oméga 3 à long terme. Après 3 mois de régime, de légères altérations des fonctionnalités rétinienne ont été détectées en particulier une diminution d'amplitude de l'onde b et une augmentation du temps de latence de l'onde A.

Cette étude met finalement clairement en évidence qu'une supplémentation en EPA et DHA à forte dose peut avoir des conséquences délétères à la fois au niveau physiologique (augmentation de masse grasse notamment) mais aussi au niveau rétinien. En effet, il est ainsi suggéré qu'un contexte de syndrome métabolique génèrerait un stress oxydatif qui offrirait des conditions favorables à des effets délétères des omégas 3 à longue chaîne dans la rétine. Enfin, ces données remettent clairement en cause l'effet préventif de l'EPA et du DHA qui avait été suggéré dans le cadre de pathologies rétinienne telles que la rétinopathie diabétique.

Chapitre 5

Discussion générale et perspectives

Jusqu'alors, très peu d'études s'étaient intéressées à caractériser l'adaptation de la rétine à un syndrome métabolique. Considérant l'importance du syndrome métabolique comme facteur de risque majeur d'un diabète de type 2 et face à l'épidémie mondiale d'obésité à laquelle notre société est confrontée, ces travaux entraient donc dans un véritable contexte d'actualité en termes de santé publique.

L'intégralité de ce projet a été menée sur le modèle animal de type rat Brown Norway et le syndrome métabolique induit par un régime enrichi à 60% de fructose.

Parmi les différentes adaptations et altérations mises en évidence dans ce modèle, notre première étude a montré qu'une période très réduite de ce régime enrichi en fructose suffisait à induire des conditions métaboliques propices à une modification de la sensibilité des cônes. Comprendre quels gènes pouvaient être impliqués dans ce processus précoce d'altération des cellules photoréceptrices devenait alors un véritable enjeu. L'analyse de l'expression des gènes par biopuces Affymetrix confirmée par RTqPCR a permis alors de cibler un réseau de cristallines ainsi que les gènes *Nid1*, *Optc*, *Npy* comme acteurs potentiels dans ce processus. De récentes études avaient notamment mis en évidence que les familles de cristallines seraient clairement impliquées dans la pathogénèse de la rétinopathie diabétique et de la DMLA (Sinha et al., 2008) (Fort et al., 2009). Leur expression pourrait constituer une réponse adaptative du tissu rétinien face à un stress (Heise et al., 2013). Nos résultats en revanche sont inversés par rapport aux données de la littérature mais ils laissent suggérer qu'un stress nutritionnel serait capable d'induire très rapidement des adaptations face à un nouvel environnement. D'autre part, notre étude conforte le fait que des atteintes des cellules neuronales rétiniennes représentent les premiers changements détectables bien avant que des complications microvasculaires ne soient observées. En effet, il a d'ailleurs été rapporté que des patients diabétiques étaient susceptibles de présenter des altérations de leurs réponses électrorétinographiques suggérant des atteintes des fonctions neurogliales, avant de développer véritablement une RD (Abcouwer and Gardner, 2014).

Notre seconde étude a permis de caractériser l'adaptation de la rétine à un régime enrichi en fructose à long terme. L'hyperinsulinémie et l'hyperleptinémie détectées, associées à l'augmentation de masse grasse et à la mise en place d'une stéatose hépatique chez le rat a permis de confirmer l'efficacité de ce type de régime riche en fructose pour induire un

syndrome métabolique chez le rat. Nous relèverons néanmoins que contrairement à d'autres études aucune modification des taux plasmatiques de cholestérol, HDL, LDL, triacylglycérol et fructosamine n'a été détectée (Citil et al., 2014). En effet, certaines études montrent que ces paramètres ne varient pas toujours. Par exemple, dans l'étude récente de Mamikutty (Mamikutty et al., 2014) seuls les taux de triacylglycerol apparaissent augmentés chez des rats Wistar rendus diabétiques par un apport en fructose sous forme de boisson pendant 8 semaines. Une étude récente a notamment montré que les paramètres plasmatiques peuvent largement varier en fonction de la richesse en fibre de la farine à laquelle le fructose est associé. Ainsi une farine blanche sans fibre dans le cadre d'un régime enrichi en fructose favoriserait l'augmentation des taux plasmatiques de TG et de glucose et réduirait les taux de HDL comparé à une association « farine complète et fructose » (Amin and Gilani, 2013). Il est également possible que la souche de rat Brown Norway utilisée ici soit moins sensible à des variations des paramètres plasmatiques.

Cet environnement diabétogène a entraîné une augmentation exacerbée de la néovascularisation lorsqu'il a été associé à un modèle d'induction de la néovascularisation par impacts laser au fond d'œil. De plus, les animaux soumis à ce régime mais non impactés ont montré une surexpression de facteurs pro-angiogéniques dans la rétine confirmant donc l'existence d'un terrain propice à des complications néovasculaires.

Par ailleurs, des altérations des fonctionnalités rétiniennes et notamment une diminution de la sensibilité des bâtonnets ainsi qu'une diminution de l'amplitude des potentiels oscillatoires ont été détectées. Ces données indiquent clairement une atteinte de la rétine neurale. A ce titre, il existerait un système de couplage entre bâtonnets et cônes (Sharpe and Stockman, 1999). En particulier, chez des souris déficientes Cx36, ce couplage serait important pour la vision en conditions de pénombre (Abd-El-Barr et al., 2009) (Seeliger et al., 2011). Une étude récente a mis en évidence que cette signalisation entre bâtonnets et cônes se ferait par l'intermédiaire de jonctions gap chez la souris (Asteriti et al., 2014). Ainsi la diminution de sensibilité des cônes observée en un premier temps à court terme, puis des bâtonnets à long terme pourrait peut-être s'expliquer par l'existence de cette communication entre cônes et bâtonnets. A ce titre, le facteur RdCVF pourrait jouer un rôle dans cette communication inter-photoréceptrice. Il serait d'ailleurs impliqué dans la maintenance des photorécepteurs et la résistance au stress oxydatif dans la rétine (Cronin et al., 2010).

Par ailleurs, l'augmentation de l'infiltration des macrophages et/ou des cellules gliales témoigne de l'inflammation créée par cet environnement pro-diabétogène dans la rétine.

Ces données encouragent clairement à poursuivre les recherches afin de définir quels mécanismes moléculaires et cellulaires exacts interviennent dans les stades précoces de la pathologie. Elles suggèrent également l'importance d'envisager une prévention dès qu'un terrain favorable au développement d'un diabète est suspecté. Nos précédentes données ont permis de mettre en évidence des atteintes de la rétine aussi bien néovasculaires, inflammatoires que fonctionnelles. Ces atteintes sont susceptibles d'apparaître dès le stade d'insulinorésistance, bien avant que l'on considère réellement que la pathologie ne soit installée. Finalement, un des aspects novateurs de ce projet a consisté en l'association de ce régime diabétogène couplé à un modèle de CNV, les résultats de ce projet ont permis de valider l'utilisation de notre modèle animal.

L'ensemble des résultats obtenus dans ces deux premières études caractérisant l'adaptation de la rétine face à un régime enrichi en fructose sont récapitulés sous forme schématique dans la *Figure 22a*. Ce schéma permet de faire le lien entre l'évolution des paramètres physiologiques et transcriptomiques menant à des conséquences fonctionnelles et cliniques.

Suite aux complications et altérations mises en évidence dans ces deux premières études, nous nous sommes proposés d'envisager lors de notre troisième et dernière étude une prévention à l'aide d'une supplémentation en EPA (10,9%) et DHA (7,2%) en accord avec des expérimentations menées auparavant dans notre laboratoire (Schnebelen et al., 2011). Ces teneurs permettant d'abaisser drastiquement le rapport oméga 6 / oméga 3 à 1,34 (initialement de 7,75 dans les régimes standard et fructose).

Cette étude s'est alors focalisée dans un premier temps sur l'effet des oméga 3 EPA et DHA sur les différents paramètres du syndrome métabolique. Hormis un effet plutôt bénéfique sur la stéatose hépatique induite par le régime enrichi en fructose, aucun effet des oméga 3 associé à un régime fructose n'a été détecté sur les paramètres plasmatiques. De plus, une augmentation de la masse grasse a été générée chez tous les animaux enrichis en oméga 3. Nous en avons donc conclu à un effet délétère à long terme de cet enrichissement au niveau physiologique.

Dans un second temps, nous nous sommes focalisés sur un possible bénéfice de l'EPA et DHA sur les complications néovasculaires précédemment identifiées. Contrairement à nos attentes, cette supplémentation a généré une atrophie de la rétine chez tous les animaux enrichis en oméga 3 après 3 mois de régime.

Ces données amènent à supposer qu'un stress oxydatif a été généré dans la rétine dans le cadre d'une peut être trop forte supplémentation en EPA et DHA. Associée à un syndrome métabolique, elle serait susceptible de constituer un terrain propice à leur oxydation et à des effets délétères pour la rétine.

Un schéma récapitulatif des résultats principaux de cette étude est présenté dans la *Figure 22b*.

Des données intéressantes, non présentées dans les articles précédents du fait d'un nombre peu important d'animaux, justifient tout de même d'être signalées. En effet, lorsque ces animaux supplémentés en omega 3 et ayant reçu des impacts lasers sont hébergés en conditions de lumière réduite (80 lux au centre de la cage sous lampe à incandescence, 280 lux sous tube à fluorescence au centre de la cage), ils ne développent pas l'atrophie observée précédemment. Ces données apparaissent en relation avec un échange paru récemment dans le journal *Experimental Eye Research* entre Luhmann (Luhmann et al., 2013) et Combadière (Combadière et al., 2013) sur l'importance des conditions lumineuses liées à l'hébergement. En effet celles-ci seraient susceptibles d'induire une prolifération de cellules microgliales et macrophagiques chez des souris Cx3cr1 -/- pour une intensité lumineuse comprise entre 100 et 500 lux. Ces données amènent à suggérer qu'une intensité lumineuse spécifique serait nécessaire pour générer le processus d'oxydation supposé dans nos expérimentations.

Des expériences complémentaires demandent donc à être réalisées afin de mieux caractériser le phénomène d'atrophie observé. Ainsi, ces données amènent à réfléchir sur l'utilité d'une supplémentation en EPA et DHA dans le cadre de pathologies oculaires telles que la RD ou plus généralement dans le cadre d'un syndrome métabolique.

Concernant les supplémentations en omega 3 reçues par les animaux de cette étude, il est important de garder à l'esprit que l'extrapolation de l'animal à l'homme n'est pas parfaite du fait d'une relation non linéaire entre l'apport alimentaire total et le poids (Rucker and Storms,

2002). Concrètement, cette supplémentation correspondrait à un apport énergétique journalier de 0,85 g de lipides (pour une moyenne de 17g de croquettes consommée/j/animal) dont 3,22% de DHA (soit 27 mg). En effet, si nous nous en tenons à une simple linéarisation vis-à-vis du poids corporel entre le rat et l'homme, un apport de 27 mg de DHA pour un rat de 300 g équivaldrait à 6300 mg pour un homme de 70 kg, soit un apport 25 fois supérieur aux 250 mg recommandés. Ainsi, selon l'étude menée par Rucker et Storms, un modèle d'extrapolation logarithmique a été défini pour différents micronutriments de type minéraux (Rucker and Storms, 2002) et serait adaptable à différents êtres vivants de poids variables (*Figure 20*). A partir de ce modèle, bien que les apports et l'assimilation des minéraux et des lipides soient clairement différents, nous proposons ici une extrapolation logarithmique similaire afin de définir l'apport nutritionnel supposé optimal en DHA pour un rat et ainsi de le comparer à la supplémentation de 27 mg/j que nous avons administrée (*Figure 21*). Cette extrapolation est réalisée à partir des apports optimaux en DHA pour un homme d'environ 70 kg (± 20 kg), soit 250 mg et d'un enfant d'un an d'environ 10 kg (± 5 kg), soit 70 mg. Celle-ci nous permet de montrer qu'une supplémentation optimale pour un rat de 300g (± 50 g) serait de $7 \pm 0,5$ mg de DHA par jour. La supplémentation en DHA de 27 mg administrée dans notre étude serait donc en moyenne 4 fois supérieure à la teneur en DHA optimale pour un rat, telle que proposée dans ce modèle.

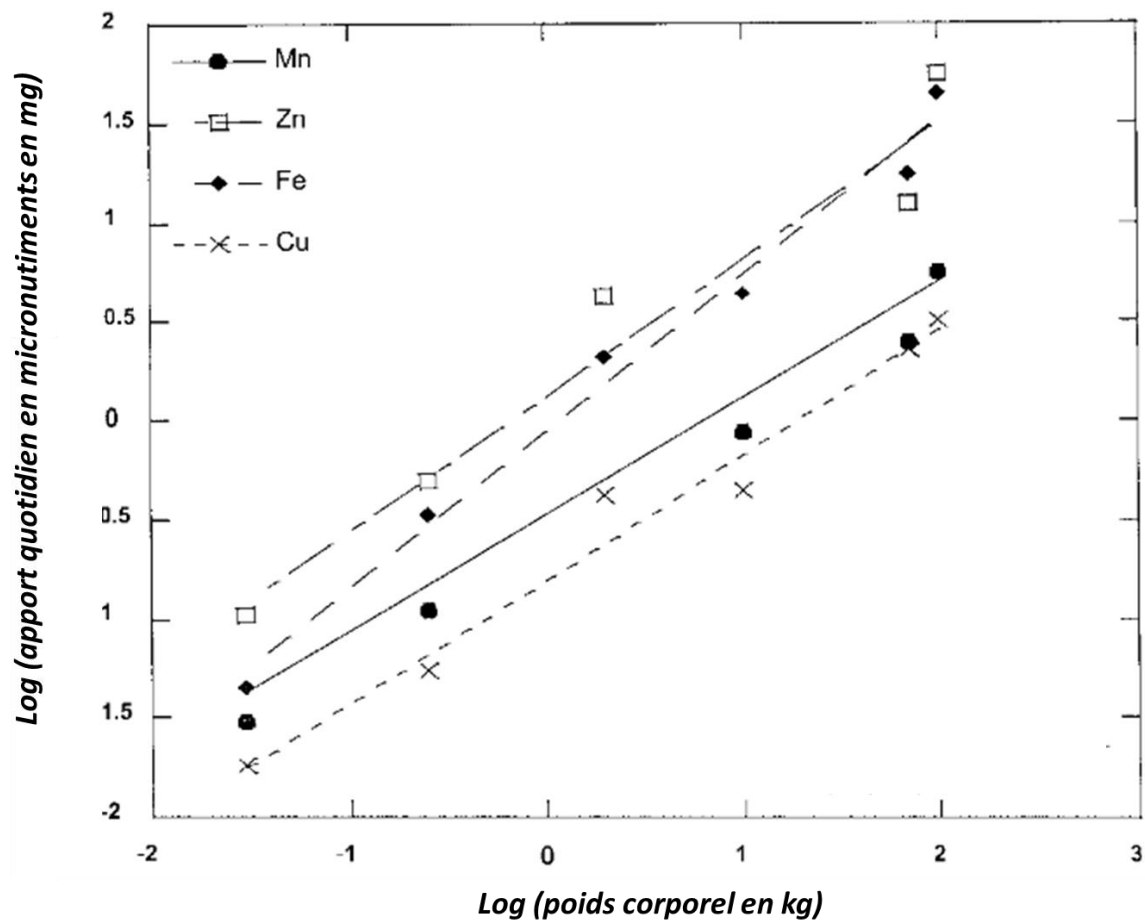
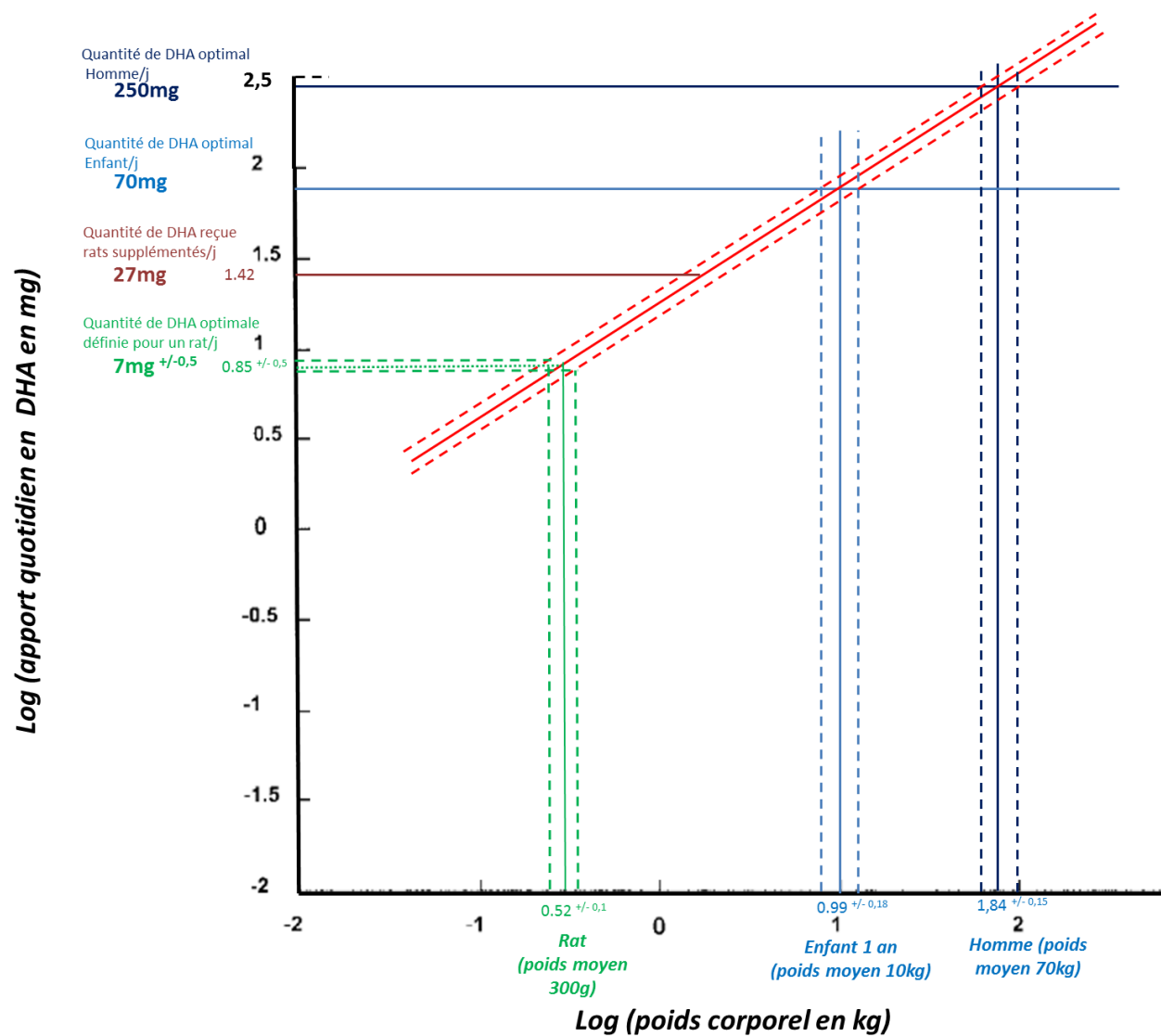


Figure 20 : Extrapolation logarithmique entre le poids et l'apport en différents micronutriments

Extrapolation logarithmique représentant l'apport journalier en différents minéraux tels que le Manganèse (Mn), le Zinc (Zn), le Fer (Fe) et le Cuivre (Cu) en fonction du poids. Valable chez la souris, le rat, le poulet, le chien et l'homme en fonction de leurs poids corporels respectifs.

Adapté de Rucker and Storms, 2002.



202

Figure 21 : Extrapolation logarithmique entre le poids et l'apport en DHA

Extrapolation logarithmique calculée à partir de l'apport journalier optimal en DHA pour un homme de 70 (± 20) kg et un enfant de 10 (± 5) kg, permettant de définir l'apport optimal pour un rat de 300 (± 50) g et de le comparer à la quantité de DHA reçue par les rats supplémentés en oméga 3.

Cette dernière étude menée au cours de ma thèse invite à réfléchir à de nombreuses perspectives quant au réel bénéfice des oméga 3. En effet bien que récemment remis en question pour leur utilité dans le cadre de la DMLA (étude AREDS2). Aucun effet délétère réel des oméga 3 n'avait été jusque-là mis en évidence dans la rétine excepté au cours d'une étude assez ancienne (Hammes et al., 1996) et d'une étude récente (Shao et al., 2014). L'étude de Hammes mettait dès lors en garde sur les possibles effets néfastes d'une supplémentation en huile de poisson pour la microvascularisation rétinienne dans le cadre d'un diabète induit par streptozotocine chez le rat. En effet, ce régime contenant 750 mg d'huile de poisson (14% d'EPA et 10% de DHA) a été administré 5 jours par semaine pendant 6 mois. Il a conduit, dans le groupe d'animaux diabétiques ayant reçu une supplémentation en oméga 3, à une augmentation de 75% des capillaires acellulaires et à leur occlusion. Cette étude laisse suggérer une possible peroxydation des oméga 3 menant à des effets pro-oxydant des vitamines C et E incluses dans le régime. Enfin, cette étude amène à s'interroger sur les possibles effets délétères de cette supplémentation sur les capillaires rétiens en absence de diabète (Hammes et al., 1996). L'étude de Shao rapportait quant à elle l'existence d'une possible implication du Cytochrome P450 2C8 et des métabolites des oméga 3 dans l'angiogenèse pathologique rétinienne (Shao et al., 2014).

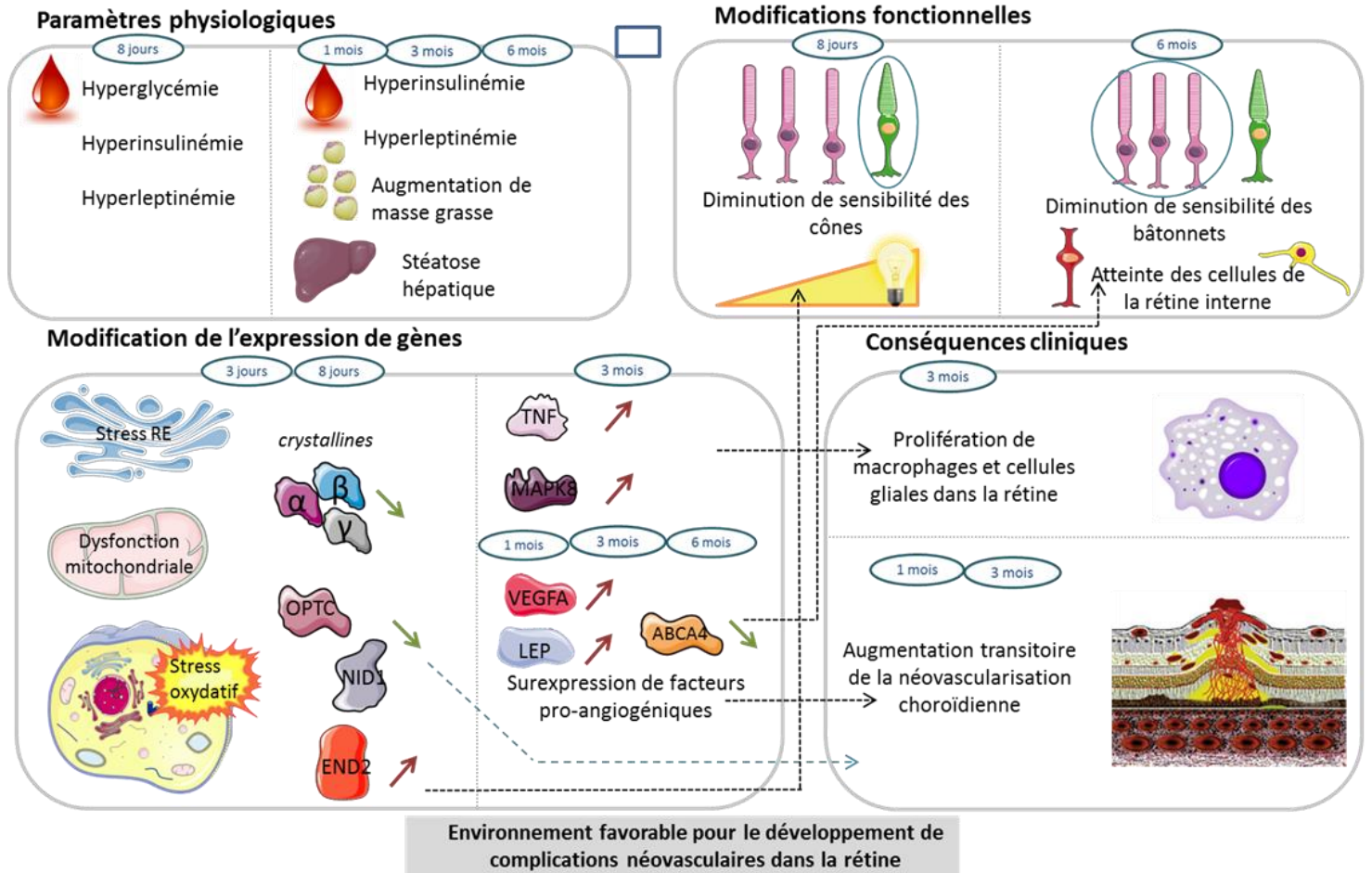
Suite à ces travaux, d'un point de vue expérimental, il apparaît nécessaire de déterminer l'effet dose, en terme de rapport oméga 6 / oméga 3 ; mais aussi en terme de quantité d'EPA et de DHA, qui serait susceptible d'être efficace d'un point de vue préventif et non délétère pour la rétine. Ne suffirait-il pas finalement d'abaisser seulement la teneur en oméga 6 et de maintenir un taux constant d'oméga 3 plutôt que de chercher toujours à enrichir le milieu nutritionnel ? De même, de plus en plus de travaux s'intéressent au DPA, intermédiaire métabolique entre l'EPA et le DHA, ne serait-il pas judicieux de tester également son efficacité ? La NPD1, en tant que métabolite oxygéné du DHA a elle aussi montré un fort intérêt d'un point de vue neuroprotecteur et reste néanmoins une piste à considérer.

Par ailleurs nos données ont mis en évidence que l'atrophie caractérisée chez les animaux enrichis en oméga 3 n'était pas présente si les animaux étaient hébergés dans des conditions lumineuses réduites, à ce titre il apparaît donc intéressant de déterminer la qualité et la quantité de la lumière permettant de limiter ces atteintes photo-oxydatives.

Le remodelage matriciel observé dans cette atrophie demande lui aussi d'autres investigations dans le but de comprendre quelles voies et gènes sont impliqués dans ce processus.

Enfin, d'un point de vue industriel, ces données nous amènent à se diriger de plus en plus vers une prévention personnalisée, dépendante de l'état physiologique et pathologique du patient, de son alimentation, de ses antécédents et de son génome. Bien que très coûteuse à ce jour, elle est sûrement la clé d'une supplémentation efficiente dans le cadre de ces pathologies oculaires. De même, il s'avère de plus en plus important de cibler les patients à risque le plus tôt possible afin que la prévention soit envisagée dans des stades très précoces et puisse faire preuve d'autant plus d'efficacité.

Ces travaux bien que défaitistes face aux effets de l'EPA et du DHA ne ferment bien entendu pas la porte à leurs éventuels bénéfices, mais ils demandent encore de nombreuses investigations dans ce domaine afin d'assurer une efficacité optimale. En revanche, une supplémentation ne doit être envisagée que si le patient ne dispose pas d'une consommation optimale de poissons gras nécessaire à maintenir ses apports nutritionnels conseillés en oméga 3 dans le cadre de sa pathologie. Limiter le stress oxydatif lorsque l'on utilise les oméga 3 dans une supplémentation apparaît être un enjeu clé. Une association avec des molécules aux propriétés antioxydantes pourrait alors s'avérer efficace. Des extraits de ginkgo biloba par exemple sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes mais aussi protectrices d'un point de vue vasculaire et neuronal (Hirooka et al., 2004). Ces molécules sont d'ailleurs déjà revendiquées à ce jour pour leur efficacité dans la pathologie du glaucome (Guo et al., 2014) (Quaranta et al., 2014). L'association de ces molécules anti-oxydantes avec des AGPI-LC de type oméga 3 pourrait être éventuellement intéressante dans le cadre de la prévention de la RD.



B

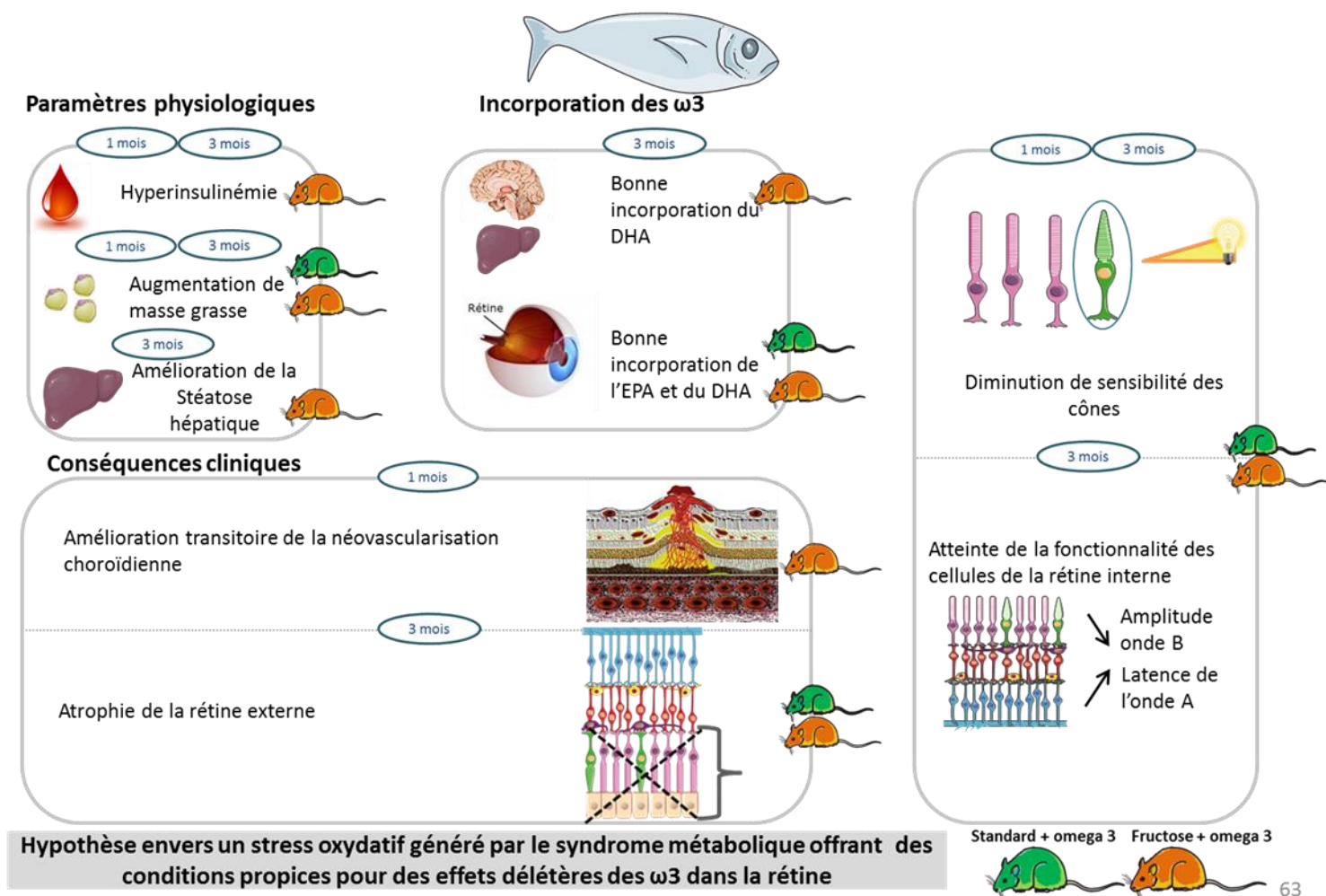


Figure 22 : Schémas bilans synthétiques

A : Schéma récapitulatif des études menées à court terme et à long terme sur la caractérisation de la réponse de la rétine face à un environnement diabétogène de type fructose.

B : Schéma récapitulatif de l'étude de supplémentation menée visant à étudier la modulation de la réponse de la rétine par une approche nutritionnelle à base d'acide gras polyinsaturés à longue de chaîne de type oméga 3.

Chapitre 6

Références bibliographiques

- Aalto, A.-M., 1999. Diabetes cognitions and social support in the management of diabetes : A Cross-sectional study on social psychological determinants of health-related quality of life and self-care among adults with type 1 diabetes.
- Abari, E., Kociok, N., Hartmann, U., Semkova, I., Paulsson, M., Lo, A., Jousen, A.M., 2013. Alterations in basement membrane immunoreactivity of the diabetic retina in three diabetic mouse models. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol.* 251, 763–775. doi:10.1007/s00417-012-2237-8
- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41–53. doi:10.1038/nrn1824
- Abcouwer, S.F., Gardner, T.W., 2014. Diabetic retinopathy: loss of neuroretinal adaptation to the diabetic metabolic environment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1311, 174–190. doi:10.1111/nyas.12412
- Abd-El-Barr, M.M., Pennesi, M.E., Saszik, S.M., Barrow, A.J., Lem, J., Bramblett, D.E., Paul, D.L., Frishman, L.J., Wu, S.M., 2009. Genetic dissection of rod and cone pathways in the dark-adapted mouse retina. *J. Neurophysiol.* 102, 1945–1955. doi:10.1152/jn.00142.2009
- Abraha, A., Humphreys, S.M., Clark, M.L., Matthews, D.R., Frayn, K.N., 1998. Acute effect of fructose on postprandial lipaemia in diabetic and non-diabetic subjects. *Br. J. Nutr.* 80, 169–175.
- Abribat, T., Nedelec, B., Jobin, N., Garrel, D.R., 2000. Decreased serum insulin-like growth factor-I in burn patients: relationship with serum insulin-like growth factor binding protein-3 proteolysis and the influence of lipid composition in nutritional support. *Crit. Care Med.* 28, 2366–2372.
- Ackman, R.G., 1981. Flame ionization detection applied to thin-layer chromatography on coated quartz rods. *Methods Enzymol.* 72, 205–252.
- Adams, A.J., Barse, M.A., 2012. Retinal neuropathy precedes vasculopathy in diabetes: a function-based opportunity for early treatment intervention? *Clin. Exp. Optim. J. Aust. Optim. Assoc.* 95, 256–265. doi:10.1111/j.1444-0938.2012.00733.x
- Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group, 2013. Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 309, 2005–2015. doi:10.1001/jama.2013.4997
- Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2001. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch. Ophthalmol.* 119, 1417–1436.
- Ahima, R.S., Prabakaran, D., Flier, J.S., 1998. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J. Clin. Invest.* 101, 1020–1027.
- Ahmadi, A., Gharipour, M., Arabzadeh, G., Moin, P., Hashemipour, M., Kelishadi, R., 2014. The Effects of Vitamin E and Omega-3 PUFAs on Endothelial Function among Adolescents with Metabolic Syndrome. *BioMed Res. Int.* 2014, 906019. doi:10.1155/2014/906019
- Ahrén, B., Månsson, S., Gingerich, R.L., Havel, P.J., 1997. Regulation of plasma leptin in mice: influence of age, high-fat diet, and fasting. *Am. J. Physiol.* 273, R113–120.

- Aiello, L.P., Bursell, S.E., Clermont, A., Duh, E., Ishii, H., Takagi, C., Mori, F., Ciulla, T.A., Ways, K., Jirousek, M., Smith, L.E., King, G.L., 1997. Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor. *Diabetes* 46, 1473–1480.
- Aiello, L.P., Clermont, A., Arora, V., Davis, M.D., Sheetz, M.J., Bursell, S.-E., 2006. Inhibition of PKC beta by oral administration of ruboxistaurin is well tolerated and ameliorates diabetes-induced retinal hemodynamic abnormalities in patients. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 86–92. doi:10.1167/iovs.05-0757
- Alberti, K.G.M.M., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J.-C., James, W.P.T., Loria, C.M., Smith, S.C., International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention, National Heart, Lung, and Blood Institute, American Heart Association, World Heart Federation, International Atherosclerosis Society, International Association for the Study of Obesity, 2009. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120, 1640–1645. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644
- Ambati, J., Anand, A., Fernandez, S., Sakurai, E., Lynn, B.C., Kuziel, W.A., Rollins, B.J., Ambati, B.K., 2003. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat. Med.* 9, 1390–1397. doi:10.1038/nm950
- Ambati, J., Fowler, B.J., 2012. Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron* 75, 26–39. doi:10.1016/j.neuron.2012.06.018
- Amin, F., Gilani, A.H., 2013. Fiber-free white flour with fructose offers a better model of metabolic syndrome. *Lipids Health Dis.* 12, 44. doi:10.1186/1476-511X-12-44
- Anderson, R.E., 1970. Lipids of ocular tissues. IV. A comparison of the phospholipids from the retina of six mammalian species. *Exp. Eye Res.* 10, 339–344.
- Anderson, R.E., Benolken, R.M., Dudley, P.A., Landis, D.J., Wheeler, T.G., 1974. Proceedings: Polyunsaturated fatty acids of photoreceptor membranes. *Exp. Eye Res.* 18, 205–213.
- Anderson, R.E., Maude, M.B., Alvarez, R.A., Acland, G., Aguirre, G.D., 1999. A hypothesis to explain the reduced blood levels of docosahexaenoic acid in inherited retinal degenerations caused by mutations in genes encoding retina-specific proteins. *Lipids* 34 Suppl, S235–237.
- Anderson, R.E., Maude, M.B., Bok, D., 2001. Low docosahexaenoic acid levels in rod outer segment membranes of mice with rds/peripherin and P216L peripherin mutations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1715–1720.
- Andley, U.P., 2007. Crystallins in the eye: Function and pathology. *Prog. Retin. Eye Res.* 26, 78–98. doi:10.1016/j.preteyeres.2006.10.003
- Ansari, N.H., Zhang, W., Fulep, E., Mansour, A., 1998. Prevention of pericyte loss by trolox in diabetic rat retina. *J. Toxicol. Environ. Health A* 54, 467–475.
- Antonetti, D.A., Barber, A.J., Bronson, S.K., Freeman, W.M., Gardner, T.W., Jefferson, L.S., Kester, M., Kimball, S.R., Krady, J.K., LaNoue, K.F., Norbury, C.C., Quinn, P.G., Sandirasegarane, L., Simpson, I.A., 2006. Diabetic Retinopathy Seeing Beyond Glucose-Induced Microvascular Disease. *Diabetes* 55, 2401–2411. doi:10.2337/db05-1635

- Arner, P., 2001. Free fatty acids--do they play a central role in type 2 diabetes? *Diabetes Obes. Metab.* 3 Suppl 1, S11–19.
- Arnasson, A., Sverrisson, T., Stefansson, E., 2006. Risk factors for five-years incident age-related macular degeneration: the Reykjavik Eye Study. *Am. J. Ophthalmol.*;142(3):419-428.
- Arrigo, A.-P., Simon, S., Gibert, B., Kretz-Remy, C., Nivon, M., Czekalla, A., Guillet, D., Moulin, M., Diaz-Latoud, C., Vicart, P., 2007. Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Lett.* 581, 3665–3674. doi:10.1016/j.febslet.2007.04.033
- Asteriti, S., Gargini, C., Cangiano, L., 2014. Mouse rods signal through gap junctions with cones. *eLife* 3, e01386. doi:10.7554/eLife.01386
- Augood, C.A., Vingerling, J.R., de Jong, P.T.V.M., Chakravarthy, U., Seland, J., Soubrane, G., Tomazzoli, L., Topouzis, F., Bentham, G., Rahu, M., Vioque, J., Young, I.S., Fletcher, A.E., 2006. Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye Study (EUREYE). *Arch. Ophthalmol.* 124, 529–535. doi:10.1001/archophth.124.4.529
- Augood, C., Chakravarthy, U., Young, I., Vioque, J., de Jong, P.T.V.M., Bentham, G., Rahu, M., Seland, J., Soubrane, G., Tomazzoli, L., Topouzis, F., Vingerling, J.R., Fletcher, A.E., 2008. Oily fish consumption, dietary docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid intakes, and associations with neovascular age-related macular degeneration. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 398–406.
- Aydin, S., Aksoy, A., Aydin, S., Kalayci, M., Yilmaz, M., Kuloglu, T., Cital, C., Catak, Z., 2014. Today's and yesterday's of pathophysiology: biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 30, 1–9. doi:10.1016/j.nut.2013.05.013
- Balasubramani, M., Schreiber, E.M., Candiello, J., Balasubramani, G.K., Kurtz, J., Halfter, W., 2010. Molecular interactions in the retinal basement membrane system: a proteomic approach. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 29, 471–483. doi:10.1016/j.matbio.2010.04.002
- Barnett, P.A., González, R.G., Chylack, L.T., Jr, Cheng, H.M., 1986. The effect of oxidation on sorbitol pathway kinetics. *Diabetes* 35, 426–432.
- Basaranoglu, M., Basaranoglu, G., Sabuncu, T., Senturk, H., 2013. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. *World J. Gastroenterol. WJG* 19, 1166–1172. doi:10.3748/wjg.v19.i8.1166
- Baynes, J.W., 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40, 405–412.
- Beck-Nielsen, H., Pedersen, O., Lindskov, H.O., 1980. Impaired cellular insulin binding and insulin sensitivity induced by high-fructose feeding in normal subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 33, 273–278.
- Beltrán-Sánchez, H., Harhay, M.O., Harhay, M.M., McElligott, S., 2013. Prevalence and trends of metabolic syndrome in the adult U.S. population, 1999-2010. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, 697–703. doi:10.1016/j.jacc.2013.05.064
- Benani, A., Hryhorczuk, C., Gouazé, A., Fioramonti, X., Brenachot, X., Guissard, C., Krezymon, A., Duparc, T., Colom, A., Nédélec, E., Rigault, C., Lemoine, A., Gascuel, J., Gerardy-Schahn, R., Valet, P., Knauf, C., Lorsignol, A., Pénicaud, L., 2012. Food intake

- adaptation to dietary fat involves PSA-dependent rewiring of the arcuate melanocortin system in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 11970–11979. doi:10.1523/JNEUROSCI.0624-12.2012
- Bender, N., Portmann, M., Heg, Z., Hofmann, K., Zwahlen, M., Egger, M., 2014. Fish or n3-PUFA intake and body composition: a systematic review and meta-analysis. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* 15, 657–665. doi:10.1111/obr.12189
- Bergmann, M., Schütt, F., Holz, F.G., Kopitz, J., 2004. Inhibition of the ATP-driven proton pump in RPE lysosomes by the major lipofuscin fluorophore A2-E may contribute to the pathogenesis of age-related macular degeneration. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 562–564. doi:10.1096/fj.03-0289fje
- Bergman, R.N., Ader, M., 2000. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 11, 351–356.
- Bhathena, S.J., 2000. Relationship between fatty acids and the endocrine system. *BioFactors Oxf. Engl.* 13, 35–39.
- Bhat, S.P., Nagineni, C.N., 1989. α B subunit of lens-specific protein α -crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158, 319–325. doi:10.1016/S0006-291X(89)80215-3
- Bhutto, I.A., McLeod, D.S., Hasegawa, T., Kim, S.Y., Merges, C., Tong, P., Luty, G.A., 2006. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* 82, 99–110. doi:10.1016/j.exer.2005.05.007
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L.L., Simonetti, R.G., Gluud, C., 2012. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Syst. Rev.* 3, CD007176. doi:10.1002/14651858.CD007176.pub2
- Bloedon, L.T., Balikai, S., Chittams, J., Cunnane, S.C., Berlin, J.A., Rader, D.J., Szapary, P.O., 2008. Flaxseed and cardiovascular risk factors: results from a double blind, randomized, controlled clinical trial. *J. Am. Coll. Nutr.* 27, 65–74.
- Bocarsly, M.E., Powell, E.S., Avena, N.M., Hoebel, B.G., 2010. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 97, 101–106. doi:10.1016/j.pbb.2010.02.012
- Bray, G.A., Nielsen, S.J., Popkin, B.M., 2004. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 537–543.
- Bretillon, L., Acar, N., Seeliger, M.W., Santos, M., Maire, M.A., Juanéda, P., Martine, L., Grégoire, S., Joffre, C., Bron, A.M., Creuzot-Garcher, C., 2008a. ApoB100,LDLR-/- mice exhibit reduced electroretinographic response and cholesteryl esters deposits in the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 1307–1314. doi:10.1167/iovs.07-0808
- Bretillon, L., Thuret, G., Grégoire, S., Acar, N., Joffre, C., Bron, A.M., Gain, P., Creuzot-Garcher, C.P., 2008b. Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and the lacrimal gland, and associations with adipose tissue fatty acids in human subjects. *Exp. Eye Res.* 87, 521–528. doi:10.1016/j.exer.2008.08.010
- Bronson-Castain, K.W., Bearse, M.A., Neuville, J., Jonasdottir, S., King-Hooper, B., Barez, S., Schneck, M.E., Adams, A.J., 2012. Early neural and vascular changes in the adolescent type 1 and type 2 diabetic retina. *Retina Phila. Pa* 32, 92–102. doi:10.1097/IAE.0b013e318219deac

- Brüning, J.C., Gautam, D., Burks, D.J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P.C., Klein, R., Krone, W., Müller-Wieland, D., Kahn, C.R., 2000. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289, 2122–2125.
- Bursać, B.N., Vasiljević, A.D., Nestorović, N.M., Veličković, N.A., Vojnović Milutinović, D.D., Matic, G.M., Djordjevic, A.D., 2014. High-fructose diet leads to visceral adiposity and hypothalamic leptin resistance in male rats--do glucocorticoids play a role? *J. Nutr. Biochem.* 25, 446–455. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.12.005
- Buschini, E., Piras, A., Nuzzi, R., Vercelli, A., 2011. Age related macular degeneration and drusen: neuroinflammation in the retina. *Prog. Neurobiol.* 95, 14–25. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.05.011
- Calder, P.C., 2006. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 1505S–1519S.
- Calippe, B., Guillonneau, X., Sennlaub, F., 2014. Complement factor H and related proteins in age-related macular degeneration. *C. R. Biol.* 337, 178–184. doi:10.1016/j.crv.2013.12.003
- Calviello, G., Di Nicuolo, F., Gragnoli, S., Piccioni, E., Serini, S., Maggiano, N., Tringali, G., Navarra, P., Ranelletti, F.O., Palozza, P., 2004. n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE2 induced ERK-1 and -2 and HIF-1alpha induction pathway. *Carcinogenesis* 25, 2303–2310. doi:10.1093/carcin/bgh265
- Calvo-Ochoa, E., Hernández-Ortega, K., Ferrera, P., Morimoto, S., Arias, C., 2014. Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 1001–1008. doi:10.1038/jcbfm.2014.48
- Campa, C., Kasman, I., Ye, W., Lee, W.P., Fuh, G., Ferrara, N., 2008. Effects of an anti-VEGF-A monoclonal antibody on laser-induced choroidal neovascularization in mice: optimizing methods to quantify vascular changes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 1178–1183. doi:10.1167/iovs.07-1194
- Capdevila, J.H., Wei, S., Helvig, C., Falck, J.R., Belosludtsev, Y., Truan, G., Graham-Lorence, S.E., Peterson, J.A., 1996. The highly stereoselective oxidation of polyunsaturated fatty acids by cytochrome P450BM-3. *J. Biol. Chem.* 271, 22663–22671.
- Caro, J.F., Sinha, M.K., Kolaczynski, J.W., Zhang, P.L., Considine, R.V., 1996. Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes* 45, 1455–1462.
- Cashman, S.M., Desai, A., Ramo, K., Kumar-Singh, R., 2011. Expression of complement component 3 (C3) from an adenovirus leads to pathology in the murine retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 3436–3445. doi:10.1167/iovs.10-6002
- Chakravarthy, U., Gardiner, T.A., 1999. Endothelium-derived agents in pericyte function/dysfunction. *Prog. Retin. Eye Res.* 18, 511–527.
- Chen, X., Zhou, H., Gong, Y., Wei, S., Zhang, M., 2014a. Early spatiotemporal characterization of microglial activation in the retinas of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* doi:10.1007/s00417-014-2727-y
- Chen, X., Zhou, H., Gong, Y., Wei, S., Zhang, M., 2014b. Early spatiotemporal characterization of microglial activation in the retinas of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* doi:10.1007/s00417-014-2727-y

- Chen, Y., Houghton, L.A., Brenna, J.T., Noy, N., 1996. Docosahexaenoic acid modulates the interactions of the interphotoreceptor retinoid-binding protein with 11-cis-retinal. *J. Biol. Chem.* 271, 20507–20515.
- Che, X., Fan, X.-Q., Wang, Z.-L., 2014. Mechanism of blood-retinal barrier breakdown induced by HIV-1 (Review). *Exp. Ther. Med.* 7, 768–772. doi:10.3892/etm.2014.1521
- Chiba, Y., Shimada, A., Kumagai, N., Yoshikawa, K., Ishii, S., Furukawa, A., Takei, S., Sakura, M., Kawamura, N., Hosokawa, M., 2009. The senescence-accelerated mouse (SAM): a higher oxidative stress and age-dependent degenerative diseases model. *Neurochem. Res.* 34, 679–687. doi:10.1007/s11064-008-9812-8
- Chiu, C.J., Milton, R.C., Gensler, G., Taylor, A. Association between dietary glycemic index and age-related macular degeneration in nondiabetic participants in the Age-Related Eye Disease Study. *Am J Clin Nutr.* 2007;86:180–188.
- Cho, E., Hung, S., Willett, W.C., Spiegelman, D., Rimm, E.B., Seddon, J.M., Colditz, G.A., Hankinson, S.E., 2001a. Prospective study of dietary fat and the risk of age-related macular degeneration. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 209–218.
- Chong, E.W.-T., Robman, L.D., Simpson, J.A., Hodge, A.M., Aung, K.Z., Dolphin, T.K., English, D.R., Giles, G.G., Guymer, R.H., 2009. Fat consumption and its association with age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 127, 674–680. doi:10.1001/archophthalmol.2009.60
- Christen, W.G., Schaumberg, D.A., Glynn, R.J., Buring, J.E., 2011. Dietary ω -3 fatty acid and fish intake and incident age-related macular degeneration in women. *Arch. Ophthalmol.* 129, 921–929. doi:10.1001/archophthalmol.2011.34
- Citil, C., Konar, V., Aydin, S., Yilmaz, M., Albayrak, S., Ozercan, I.H., Ozkan, Y., 2014. Brain, Liver, and Serum Salusin- α and - β Alterations in Sprague-Dawley Rats with or without Metabolic Syndrome. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 20, 1326–1333. doi:10.12659/MSM.890708
- Clément, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gormelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.M., Basdevant, A., Bougnères, P., Lehouc, Y., Froguel, P., Guy-Grand, B., 1998. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392, 398–401. doi:10.1038/32911
- Clemons, T.E., Milton, R.C., Klein, R., Seddon, J.M., Ferris, F.L., 3rd, Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2005. Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19. *Ophthalmology* 112, 533–539. doi:10.1016/j.ophtha.2004.10.047
- Coffey, P.J., Gias, C., McDermott, C.J., Lundh, P., Pickering, M.C., Sethi, C., Bird, A., Fitzke, F.W., Maass, A., Chen, L.L., Holder, G.E., Luthert, P.J., Salt, T.E., Moss, S.E., Greenwood, J., 2007. Complement factor H deficiency in aged mice causes retinal abnormalities and visual dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16651–16656. doi:10.1073/pnas.0705079104
- Coleman, D.L., Hummel, K.P., 1969. Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am. J. Physiol.* 217, 1298–1304.
- Combadière, C., Feumi, C., Raoul, W., Keller, N., Rodéro, M., Pézard, A., Lavalette, S., Houssier, M., Jonet, L., Picard, E., Debré, P., Sirinyan, M., Deterre, P., Ferroukhi, T., Cohen, S.-Y., Chauvaud, D., Jeanny, J.-C., Chemtob, S., Behar-Cohen, F., Sennlaub, F.,

- 2007b. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J. Clin. Invest.* 117, 2920–2928. doi:10.1172/JCI31692
- Combadière, C., Potteaux, S., Gao, J.-L., Esposito, B., Casanova, S., Lee, E.J., Debré, P., Tedgui, A., Murphy, P.M., Mallat, Z., 2003. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* 107, 1009–1016.
- Combadière, C., Potteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B., Merval, R., Proudfoot, A., Tedgui, A., Mallat, Z., 2008. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 117, 1649–1657. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.745091
- Combadière, C., Raoul, W., Guillonnet, X., Sennlaub, F. 2013. Comment on "Ccl2, Cx3cr1 and Ccl2/Cx3cr1 chemokine deficiencies are not sufficient to cause age-related retinal degeneration" by Luhmann et al. (*Exp. Eye Res.* 2013; 107: 80. doi: 10.1016). *Exp. Eye Res.* 111:134-5. doi: 10.1016/
- Comer, G.M., Ciulla, T.A., 2004. Pharmacotherapy for diabetic retinopathy. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 15.208-518.
- Congdon, N.G., Friedman, D.S., Lietman, T., 2003. Important causes of visual impairment in the world today. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 290, 2057–2060. doi:10.1001/jama.290.15.2057
- Connor, K.M., SanGiovanni, J.P., Lofqvist, C., Aderman, C.M., Chen, J., Higuchi, A., Hong, S., Pravda, E.A., Majchrzak, S., Carper, D., Hellstrom, A., Kang, J.X., Chew, E.Y., Salem, N., Jr, Serhan, C.N., Smith, L.E.H., 2007. Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat. Med.* 13, 868–873. doi:10.1038/nm1591
- Cousins, S.W., Espinosa-Heidmann, D.G., Alexandridou, A., Sall, J., Dubovy, S., Csaky, K., 2002. The role of aging, high fat diet and blue light exposure in an experimental mouse model for basal laminar deposit formation. *Exp. Eye Res.* 75, 543–553.
- Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., Garcia-Segura, L.M., Nillni, E.A., Mendez, P., Low, M.J., Sotonyi, P., Friedman, J.M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W.F., Cone, R.D., Horvath, T.L., 2003. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37, 649–661.
- Cronin, T., Raffelsberger, W., Lee-Rivera, I., Jaillard, C., Niepon, M.-L., Kinzel, B., Clerin, E., Petrosian, A., Picaud, S., Poch, O., Sahel, J.-A., Leveillard, T., 2010. The disruption of the rod-derived cone viability gene leads to photoreceptor dysfunction and susceptibility to oxidative stress. *Cell Death Differ.* 17, 1199–1210. doi:10.1038/cdd.2010.2
- Cruickshanks, K.J., Klein, R., Klein, B.E., 1993. Sunlight and age-related macular degeneration. The Beaver Dam Eye Study. *Arch. Ophthalmol.* 111, 514–518.
- Cruz-Guilloty, F., Saeed, A.M., Duffort, S., Cano, M., Ebrahimi, K.B., Ballmick, A., Tan, Y., Wang, H., Laird, J.M., Salomon, R.G., Handa, J.T., Perez, V.L., 2014. T Cells and Macrophages Responding to Oxidative Damage Cooperate in Pathogenesis of a Mouse

- Model of Age-Related Macular Degeneration. PLoS ONE 9. doi:10.1371/journal.pone.0088201
- Cui, Y., Xu, X., Bi, H., Zhu, Q., Wu, J., Xia, X., Qiushi Ren, Ho, P.C.P., 2006. Expression modification of uncoupling proteins and MnSOD in retinal endothelial cells and pericytes induced by high glucose: the role of reactive oxygen species in diabetic retinopathy. *Exp. Eye Res.* 83, 807–816. doi:10.1016/j.exer.2006.03.024
- Cunha-Vaz, J.G., 1997. The blood-ocular barriers: past, present, and future. *Doc. Ophthalmol. Adv. Ophthalmol.* 93, 149–157.
- Curry, D.L., 1989. Effects of mannose and fructose on the synthesis and secretion of insulin. *Pancreas* 4, 2–9.
- Daemen, F.J., 1973. Vertebrate rod outer segment membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 300, 255–288.
- Das, U.N., 2013. Lipoxins, resolvins, and protectins in the prevention and treatment of diabetic macular edema and retinopathy. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 29, 1–7. doi:10.1016/j.nut.2012.02.003
- Dekker, M.J., Su, Q., Baker, C., Rutledge, A.C., Adeli, K., 2010. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299, E685–694. doi:10.1152/ajpendo.00283.2010
- Delbosc, S., Paizanis, E., Magous, R., Araiz, C., Dimo, T., Cristol, J.-P., Cros, G., Azay, J., 2005. Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis* 179, 43–49. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.10.018
- Delcourt, C., Diaz, J.L., Ponton-Sanchez, A., Papoz, L., 1998. Smoking and age-related macular degeneration. The POLA Study. *Pathologies Oculaires Liées à l'Age. Arch. Ophthalmol.* 116, 1031–1035.
- Delcourt, C., Carriere, J., Cristol, J.P., Lacrous, A., Gerber, M., 2007. Dietary fat and the risk of age-related maculopathy: the POLANUT Study. *Eur J Clin Nutr*;61(11):1341-1344.
- Dembélé, D., Kastner, P., 2014. Fold change rank ordering statistics: a new method for detecting differentially expressed genes. *BMC Bioinformatics* 15, 14. doi:10.1186/1471-2105-15-14
- Deshpande, A.D., Harris-Hayes, M., Schootman, M., 2008. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys. Ther.* 88, 1254–1264. doi:10.2522/ptj.20080020
- De Urquiza, A.M., Liu, S., Sjöberg, M., Zetterström, R.H., Griffiths, W., Sjövall, J., Perlmann, T., 2000. Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290, 2140–2144.
- Dewell, A., Marvasti, F.F., Harris, W.S., Tsao, P., Gardner, C.D., 2011. Low- and high-dose plant and marine (n-3) fatty acids do not affect plasma inflammatory markers in adults with metabolic syndrome. *J. Nutr.* 141, 2166–2171. doi:10.3945/jn.111.142240
- De Wilde, M.C., Farkas, E., Gerrits, M., Kiliaan, A.J., Luiten, P.G.M., 2002. The effect of n-3 polyunsaturated fatty acid-rich diets on cognitive and cerebrovascular parameters in chronic cerebral hypoperfusion. *Brain Res.* 947, 166–173.
- Dithmar, S., Curcio, C.A., Le, N.A., Brown, S., Grossniklaus, H.E., 2000. Ultrastructural changes in Bruch's membrane of apolipoprotein E-deficient mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 2035–2042.

- Dreyer, C., Keller, H., Mahfoudi, A., Laudet, V., Krey, G., Wahli, W., 1993. Positive regulation of the peroxisomal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* 77, 67–76.
- Du, H., Sun, X., Guma, M., Luo, J., Ouyang, H., Zhang, X., Zeng, J., Quach, J., Nguyen, D.H., Shaw, P.X., Karin, M., Zhang, K., 2013. JNK inhibition reduces apoptosis and neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 2377–2382. doi:10.1073/pnas.1221729110
- Edwards, A.O., Ritter, R., 3rd, Abel, K.J., Manning, A., Panhuysen, C., Farrer, L.A., 2005. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 308, 421–424. doi:10.1126/science.1110189
- Elliott, S.S., Keim, N.L., Stern, J.S., Teff, K., Havel, P.J., 2002. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 911–922.
- El-seweidy, M.M., El-Swefy, S.E., Ameen, R.S., Hashem, R.M., 2002. Effect of age receptor blocker and/or anti-inflammatory coadministration in relation to glycation, oxidative stress and cytokine production in stz diabetic rats. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 45, 391–398.
- Énzsöly, A., Szabó, A., Kántor, O., Dávid, C., Szalay, P., Szabó, K., Szél, Á., Németh, J., Lukáts, Á., 2014. Pathologic alterations of the outer retina in streptozotocin-induced diabetes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 3686–3699. doi:10.1167/iovs.13-13562
- Ersoy, L., Ristau, T., Lechanteur, Y.T., Hahn, M., Hoyng, C.B., Kirchhof, B., den Hollander, A.I., Fauser, S., 2014. Nutritional risk factors for age-related macular degeneration. *BioMed Res. Int.* 2014, 413150. doi:10.1155/2014/413150
- Eskelinen, E.-L., 2008. New insights into the mechanisms of macroautophagy in mammalian cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 266, 207–247. doi:10.1016/S1937-6448(07)66005-5
- Espinosa-Heidmann, D.G., Suner, I.J., Catanuto, P., Hernandez, E.P., Marin-Castano, M.E., Cousins, S.W., 2006. Cigarette smoke-related oxidants and the development of sub-RPE deposits in an experimental animal model of dry AMD. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 729–737. doi:10.1167/iovs.05-0719
- Faintuch, J., Horie, L.M., Barbeiro, H.V., Barbeiro, D.F., Soriano, F.G., Ishida, R.K., Ceconello, I., 2007. Systemic inflammation in morbidly obese subjects: response to oral supplementation with alpha-linolenic acid. *Obes. Surg.* 17, 341–347. doi:10.1007/s11695-007-9062-x
- Feillet-Coudray, C., Fouret, G., Ebabe Elle, R., Rieusset, J., Bonafos, B., Chabi, B., Crouzier, D., Zarkovic, K., Zarkovic, N., Ramos, J., Badia, E., Murphy, M.P., Cristol, J.P., Coudray, C., 2014. The mitochondrial-targeted antioxidant MitoQ ameliorates metabolic syndrome features in obesogenic diet-fed rats better than Apocynin or Allopurinol. *Free Radic. Res.* 48, 1232–1246. doi:10.3109/10715762.2014.945079
- Flachs, P., Rossmeisl, M., Kopecky, J., 2014. The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 63 Suppl 1, S93–118.
- Fliesler, S.J., Anderson, R.E., 1983. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog. Lipid Res.* 22, 79–131.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.

- Fort, P.E., Freeman, W.M., Losiewicz, M.K., Singh, R.S.J., Gardner, T.W., 2009. The retinal proteome in experimental diabetic retinopathy: up-regulation of crystallins and reversal by systemic and periocular insulin. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 8, 767–779. doi:10.1074/mcp.M800326-MCP200
- Fortune, B., Schneck, M.E., Adams, A.J., 1999. Multifocal electroretinogram delays reveal local retinal dysfunction in early diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 2638–2651.
- Fourgeux, C., Martine, L., Acar, N., Bron, A.M., Creuzot-Garcher, C.P., Bretillon, L., 2014. In vivo consequences of cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) inhibition by voriconazole on cholesterol homeostasis and function in the rat retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 775–781. doi:10.1016/j.bbrc.2014.01.118
- Frampton, J.E., 2013. Ranibizumab: a review of its use in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Drugs Aging* 30, 331–358. doi:10.1007/s40266-013-0077-9
- Friedman, D.S., Katz, J., Bressler, N.M., Rahmani, B., Tielsch, J.M., 1999. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 106, 1049–1055. doi:10.1016/S0161-6420(99)90267-1
- Friedman, D.S., O'Colmain, B.J., Muñoz, B., Tomany, S.C., McCarty, C., de Jong, P.T.V.M., Nemesure, B., Mitchell, P., Kempen, J., Eye Diseases Prevalence Research Group, 2004. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch. Ophthalmol.* 122, 564–572. doi:10.1001/archophth.122.4.564
- Fujihara, M., Bartels, E., Nielsen, L.B., Handa, J.T., 2009. A human apoB100 transgenic mouse expresses human apoB100 in the RPE and develops features of early AMD. *Exp. Eye Res.* 88, 1115–1123. doi:10.1016/j.exer.2009.01.017
- Fukami, T., Sun, X., Li, T., Yamada, M., Desai, M., Ross, M.G., 2013. Mechanism of programmed obesity: altered central insulin sensitivity in growth-restricted juvenile female rats. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 4, 239–248. doi:10.1017/S2040174413000019
- Gabbay, K.H., 1973. The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *N. Engl. J. Med.* 288, 831–836. doi:10.1056/NEJM197304192881609
- Gabbay, K.H., 1975. Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus. *Annu. Rev. Med.* 26, 521–536. doi:10.1146/annurev.me.26.020175.002513
- Garay, R.P., Hannaert, P., Chiavaroli, C., 2005. Calcium dobesilate in the treatment of diabetic retinopathy. *Treat. Endocrinol.* 4, 221–232.
- Gaucher, D., Chiappore, J.-A., Pâques, M., Simonutti, M., Boitard, C., Sahel, J.A., Massin, P., Picaud, S., 2007. Microglial changes occur without neural cell death in diabetic retinopathy. *Vision Res.* 47, 612–623. doi:10.1016/j.visres.2006.11.017
- Gerstenblith, A.T., Baskin, D.E., Shah, C.P., Wolfe, J.D., Fineman, M.S., Kaiser, R.S., Ho, A.C., 2013. Electroretinographic effects of omega-3 Fatty Acid supplementation on dry age-related macular degeneration. *JAMA Ophthalmol.* 131, 365–369. doi:10.1001/jamaophthalmol.2013.642
- Giacco, F., Brownlee, M., 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* 107, 1058–1070. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223545
- Go, A.S., Mozaffarian, D., Roger, V.L., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Blaha, M.J., Dai, S., Ford, E.S., Fox, C.S., Franco, S., Fullerton, H.J., Gillespie, C., Hailpern, S.M., Heit, J.A., Howard, V.J., Huffman, M.D., Judd, S.E., Kissela, B.M., Kittner, S.J., Lackland, D.T.,

- Lichtman, J.H., Lisabeth, L.D., Mackey, R.H., Magid, D.J., Marcus, G.M., Marelli, A., Matchar, D.B., McGuire, D.K., Mohler, E.R., Moy, C.S., Mussolino, M.E., Neumar, R.W., Nichol, G., Pandey, D.K., Paynter, N.P., Reeves, M.J., Sorlie, P.D., Stein, J., Towfighi, A., Turan, T.N., Virani, S.S., Wong, N.D., Woo, D., Turner, M.B., American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, 2014. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 129, 399–410. doi:10.1161/01.cir.0000442015.53336.12
- Göttlicher, M., Demoz, A., Svensson, D., Tollet, P., Berge, R.K., Gustafsson, J.A., 1993. Structural and metabolic requirements for activators of the peroxisome proliferator-activated receptor. *Biochem. Pharmacol.* 46, 2177–2184.
- Grant, A.M., Christie, M.R., Ashcroft, S.J., 1980. Insulin release from human pancreatic islets in vitro. *Diabetologia* 19, 114–117.
- Gray, B., Steyn, F., Davies, P.S.W., Vitetta, L., 2013. Omega-3 fatty acids: a review of the effects on adiponectin and leptin and potential implications for obesity management. *Eur. J. Clin. Nutr.* 67, 1234–1242. doi:10.1038/ejcn.2013.197
- Gray, B., Steyn, F., Davies, P.S.W., Vitetta, L., 2013. Omega-3 fatty acids: a review of the effects on adiponectin and leptin and potential implications for obesity management. *Eur. J. Clin. Nutr.* 67, 1234–1242. doi:10.1038/ejcn.2013.197
- Grossniklaus, H.E., Kang, S.J., Berglin, L., 2010. Animal models of choroidal and retinal neovascularization. *Prog. Retin. Eye Res.* 29, 500–519. doi:10.1016/j.preteyeres.2010.05.003
- Grossniklaus, H.E., Kang, S.J., Berglin, L., 2010. Animal models of choroidal and retinal neovascularization. *Prog. Retin. Eye Res.* 29, 500–519. doi:10.1016/j.preteyeres.2010.05.003
- Grossniklaus, H.E., Ling, J.X., Wallace, T.M., Dithmar, S., Lawson, D.H., Cohen, C., Elner, V.M., Elner, S.G., Sternberg, P., Jr, 2002. Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Mol. Vis.* 8, 119–126.
- Guo, X., Kong, X., Huang, R., Jin, L., Ding, X., He, M., Liu, X., Patel, M.C., Congdon, N.G., 2014. Effect of Ginkgo biloba on visual field and contrast sensitivity in Chinese patients with normal tension glaucoma: a randomized, crossover clinical trial. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 110–116. doi:10.1167/iovs.13-13168
- Gupta, N., Brown, K.E., Milam, A.H., 2003. Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* 76, 463–471.
- Hahn, P., Acquah, K., Cousins, S.W., Lee, P.P., Sloan, F.A., 2013a. Ten-year incidence of age-related macular degeneration according to diabetic retinopathy classification among medicare beneficiaries. *Retina Phila. Pa* 33, 911–919. doi:10.1097/IAE.0b013e3182831248
- Haines, J.L., Hauser, M.A., Schmidt, S., Scott, W.K., Olson, L.M., Gallins, P., Spencer, K.L., Kwan, S.Y., Nouredine, M., Gilbert, J.R., Schnetz-Boutaud, N., Agarwal, A., Postel, E.A., Pericak-Vance, M.A., 2005. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308, 419–421. doi:10.1126/science.1110359
- Halapin, N.A., Bazan, N.G., 2010. NPD1 induction of retinal pigment epithelial cell survival involves PI3K/Akt phosphorylation signaling. *Neurochem. Res.* 35, 1944–1947. doi:10.1007/s11064-010-0351-8

- Hammes, D.H.-P., Weiss, A., Führer, D., Krämer, H.J., Papavassilis, C., Grimminger, F., 1996. Acceleration of experimental diabetic retinopathy in the rat by omega-3 fatty acids. *Diabetologia* 39, 251–255. doi:10.1007/BF00418338
- Hammes, H.P., Bartmann, A., Engel, L., Wülfroth, P., 1997. Antioxidant treatment of experimental diabetic retinopathy in rats with nicanartine. *Diabetologia* 40, 629–634. doi:10.1007/s001250050726
- Hammes, H.-P., Du, X., Edelstein, D., Taguchi, T., Matsumura, T., Ju, Q., Lin, J., Bierhaus, A., Nawroth, P., Hannak, D., Neumaier, M., Bergfeld, R., Giardino, I., Brownlee, M., 2003. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat. Med.* 9, 294–299. doi:10.1038/nm834
- Hammes, H.P., Martin, S., Federlin, K., Geisen, K., Brownlee, M., 1991. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11555–11558.
- Hancock, H.A., Kraft, T.W., 2004. Oscillatory potential analysis and ERGs of normal and diabetic rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 1002–1008.
- Han, M.S., Jung, D.Y., Morel, C., Lakhani, S.A., Kim, J.K., Flavell, R.A., Davis, R.J., 2013. JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science* 339, 218–222. doi:10.1126/science.1227568
- Hannibal, J., Fahrenkrug, J., 2002. Melanopsin: a novel photopigment involved in the photoentrainment of the brain's biological clock? *Ann. Med.* 34, 401–407.
- Hardwick, J.P., Eckman, K., Lee, Y.K., Abdelmegeed, M.A., Esterle, A., Chilian, W.M., Chiang, J.Y., Song, B.-J., 2013. Eicosanoids in Metabolic Syndrome. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 66, 157–266. doi:10.1016/B978-0-12-404717-4.00005-6
- Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.
- Havel, P.J., 2001. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 226, 963–977.
- Havel, P.J., Kasim-Karakas, S., Mueller, W., Johnson, P.R., Gingerich, R.L., Stern, J.S., 1996. Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 4406–4413. doi:10.1210/jcem.81.12.8954050
- Hawkins, M., Gabriely, I., Wozniak, R., Vilcu, C., Shamon, H., Rossetti, L., 2002. Fructose improves the ability of hyperglycemia per se to regulate glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 606–614.
- Heckenlively, J.R., Hawes, N.L., Friedlander, M., Nusinowitz, S., Hurd, R., Davisson, M., Chang, B., 2003. Mouse model of subretinal neovascularization with choroidal anastomosis. *Retina Phila. Pa* 23, 518–522.
- Heise, E.A., Marozas, L.M., Grafton, S.A., Green, K.M., Kirwin, S.J., Fort, P.E., 2013a. Strain-independent increases of crystallin proteins in the retina of type 1 diabetic rats. *PloS One* 8, e82520. doi:10.1371/journal.pone.0082520
- Hellerstein, M.K., Schwarz, J.M., Neese, R.A., 1996. Regulation of hepatic de novo lipogenesis in humans. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 523–557. doi:10.1146/annurev.nu.16.070196.002515

- Hellstrom, A., Perruzzi, C., Ju, M., Engstrom, E., Hard, A.L., Liu, J.L., Albertsson-Wikland, K., Carlsson, B., Niklasson, A., Sjodell, L., LeRoith, D., Senger, D.R., Smith, L.E., 2001. Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5804–5808. doi:10.1073/pnas.101113998
- Hickey, W.F., Kimura, H., 1988. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239, 290–292.
- Hirai, F.E., Tielsch, J.M., Klein, B.E.K., Klein, R., 2013. Ten-year change in self-rated quality of life in a type 1 diabetes population: Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Qual. Life Res. Int. J. Qual. Life Asp. Treat. Care Rehabil.* 22, 1245–1253. doi:10.1007/s11136-012-0245-0
- Hirooka, K., Tokuda, M., Miyamoto, O., Itano, T., Baba, T., Shiraga, F., 2004. The Ginkgo biloba extract (EGb 761) provides a neuroprotective effect on retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma. *Curr. Eye Res.* 28, 153–157. doi:10.1076/ceyr.28.3.153.26246
- Hoffman, D.R., DeMar, J.C., Heird, W.C., Birch, D.G., Anderson, R.E., 2001. Impaired synthesis of DHA in patients with X-linked retinitis pigmentosa. *J. Lipid Res.* 42, 1395–1401.
- Hollyfield, J.G., Bonilha, V.L., Rayborn, M.E., Yang, X., Shadrach, K.G., Lu, L., Ufret, R.L., Salomon, R.G., Perez, V.L., 2008. Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nat. Med.* 14, 194–198. doi:10.1038/nm1709
- Hunter, J.J., Morgan, J.I.W., Merigan, W.H., Sliney, D.H., Sparrow, J.R., Williams, D.R., 2012. The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light. *Prog. Retin. Eye Res.* 31, 28–42. doi:10.1016/j.preteyeres.2011.11.001
- Hwang, I.S., Ho, H., Hoffman, B.B., Reaven, G.M., 1987. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 10, 512–516. doi:10.1161/01.HYP.10.5.512
- Hwang, I.S., Huang, W.C., Wu, J.N., Shian, L.R., Reaven, G.M., 1989. Effect of fructose-induced hypertension on the renin-angiotensin-aldosterone system and atrial natriuretic factor. *Am. J. Hypertens.* 2, 424–427.
- Imamura, Y., Noda, S., Hashizume, K., Shinoda, K., Yamaguchi, M., Uchiyama, S., Shimizu, T., Mizushima, Y., Shirasawa, T., Tsubota, K., 2006. Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11282–11287. doi:10.1073/pnas.0602131103
- Itoh, M., Suganami, T., Satoh, N., Tanimoto-Koyama, K., Yuan, X., Tanaka, M., Kawano, H., Yano, T., Aoe, S., Takeya, M., Shimatsu, A., Kuzuya, H., Kamei, Y., Ogawa, Y., 2007. Increased adiponectin secretion by highly purified eicosapentaenoic acid in rodent models of obesity and human obese subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1918–1925. doi:10.1161/ATVBAHA.106.136853
- Jaissle, G.B., May, C.A., Reinhard, J., Kohler, K., Fauser, S., Lütjen-Drecoll, E., Zrenner, E., Seeliger, M.W., 2001. Evaluation of the rhodopsin knockout mouse as a model of pure cone function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 506–513.
- Jeffrey, B.G., Weisinger, H.S., Neuringer, M., Mitchell, D.C., 2001. The role of docosahexaenoic acid in retinal function. *Lipids* 36, 859–871.

- Jeppesen, J., Chen, Y.I., Zhou, M.Y., Schaaf, P., Coulston, A., Reaven, G.M., 1995. Postprandial triglyceride and retinyl ester responses to oral fat: effects of fructose. *Am. J. Clin. Nutr.* 61, 787–791.
- Jéquier, E., Tappy, L., 1999. Regulation of body weight in humans. *Physiol. Rev.* 79, 451–480.
- Jesmin, S., Akter, S., Rahman, M.M., Islam, M.M., Islam, A.M.S., Sultana, S.N., Mowa, C.N., Yamaguchi, N., Okazaki, O., Satoru, K., Kimura, S., Hiroe, M., Mizutani, T., Moroi, M., 2013. Disruption of components of vascular endothelial growth factor angiogenic signalling system in metabolic syndrome. Findings from a study conducted in rural Bangladeshi women. *Thromb. Haemost.* 109, 696–705. doi:10.1160/TH12-09-0654
- Juen, S., Kieselbach, G.F., 1990. Electrophysiological changes in juvenile diabetics without retinopathy. *Arch. Ophthalmol.* 108, 372–375.
- Jump, D.B., 2011. Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 14, 115–120. doi:10.1097/MCO.0b013e328342991c
- Justilien, V., Pang, J.-J., Renganathan, K., Zhan, X., Crabb, J.W., Kim, S.R., Sparrow, J.R., Hauswirth, W.W., Lewin, A.S., 2007. SOD2 knockdown mouse model of early AMD. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 4407–4420. doi:10.1167/iovs.07-0432
- Kaarniranta, K., Sinha, D., Blasiak, J., Kauppinen, A., Veréb, Z., Salminen, A., Boulton, M.E., Petrovski, G., 2013. Autophagy and heterophagy dysregulation leads to retinal pigment epithelium dysfunction and development of age-related macular degeneration. *Autophagy* 9, 973–984. doi:10.4161/auto.24546
- Kalupahana, N.S., Moustaid-Moussa, N., Claycombe, K.J., 2012. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. *Mol. Aspects Med.* 33, 26–34. doi:10.1016/j.mam.2011.10.011
- Kanarek, R.B., Orthen-Gambill, N., 1982. Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats. *J. Nutr.* 112, 1546–1554.
- Kannan, R., Sreekumar, P.G., Hinton, D.R., 2012. Novel roles for α -crystallins in retinal function and disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 31, 576–604. doi:10.1016/j.preteyeres.2012.06.001
- Karsenty, J., Landrier, J.-F., Rousseau-Ralliard, D., Robbez-Masson, V., Margotat, A., Deprez, P., Lechêne, P., Grynberg, A., Lairon, D., Planells, R., Gastaldi, M., 2013. Beneficial effects of omega-3 fatty acids on the consequences of a fructose diet are not mediated by PPAR delta or PGC1 alpha. *Eur. J. Nutr.* 52, 1865–1874. doi:10.1007/s00394-012-0488-0
- Kase, S., Ishida, S., Rao, N.A., 2011. Increased expression of α A-crystallin in human diabetic eye. *Int. J. Mol. Med.* 28, 505–511. doi:10.3892/ijmm.2011.708
- Kasim-Karakas, S.E., Vriend, H., Almario, R., Chow, L.C., Goodman, M.N., 1996. Effects of dietary carbohydrates on glucose and lipid metabolism in golden Syrian hamsters. *J. Lab. Clin. Med.* 128, 208–213.
- Kaur, J., 2014. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiol. Res. Pract.* 2014, 943162. doi:10.1155/2014/943162
- Keenan, T.D.L., Clark, S.J., Unwin, R.D., Ridge, L.A., Day, A.J., Bishop, P.N., 2012. Mapping the differential distribution of proteoglycan core proteins in the adult human

- retina, choroid, and sclera. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 7528–7538. doi:10.1167/iovs.12-10797
- Kern, T.S., 2007. Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Exp. Diabetes Res.* 2007, 95103. doi:10.1155/2007/95103
- Killingsworth, M.C., 1995. Angiogenesis in early choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol.* 233, 313–323.
- Kim, Y.H., Choi, M.Y., Kim, Y.S., Han, J.M., Lee, J.H., Park, C.H., Kang, S.S., Choi, W.S., Cho, G.J., 2007. Protein kinase C delta regulates anti-apoptotic alphaB-crystallin in the retina of type 2 diabetes. *Neurobiol. Dis.* 28, 293–303. doi:10.1016/j.nbd.2007.07.017
- Kinoshita, J.H., 1990. A thirty year journey in the polyol pathway. *Exp. Eye Res.* 50, 567–573.
- Kishan, A.U., Modjtahedi, B.S., Martins, E.N., Modjtahedi, S.P., Morse, L.S., 2011. Lipids and age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 56, 195–213. doi:10.1016/j.survophthal.2010.08.008
- Klaassen, I., Hughes, J.M., Vogels, I.M.C., Schalkwijk, C.G., Van Noorden, C.J.F., Schlingemann, R.O., 2009. Altered expression of genes related to blood-retina barrier disruption in streptozotocin-induced diabetes. *Exp. Eye Res.* 89, 4–15. doi:10.1016/j.exer.2009.01.006
- Klein, R.J., Zeiss, C., Chew, E.Y., Tsai, J.-Y., Sackler, R.S., Haynes, C., Henning, A.K., SanGiovanni, J.P., Mane, S.M., Mayne, S.T., Bracken, M.B., Ferris, F.L., Ott, J., Barnstable, C., Hoh, J., 2005. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308, 385–389. doi:10.1126/science.1109557
- Klein, R., Klein, B.E.K., 2013. The Prevalence of Age-Related Eye Diseases and Visual Impairment in Aging: Current Estimates. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, ORSF5–ORSF13. doi:10.1167/iovs.13-12789
- Klein, R., Klein, B.E.K., Lee, K.E., 1996. Changes in Visual Acuity in a Population. *Ophthalmology* 103, 1169–1178. doi:10.1016/S0161-6420(96)30526-5
- Klein, R., Klein, B.E.K., Tomany, S.C., Cruickshanks, K.J., 2003. The association of cardiovascular disease with the long-term incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 110, 1273–1280. doi:10.1016/S0161-6420(03)00599-2
- Klein, R., Klein, B.E., Linton, K.L., 1992a. Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 99, 933–943.
- Klein, R., Klein, B.E., Moss, S.E., 1992b. Epidemiology of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 15, 1875–1891.
- Kliffen, M., Lutgens, E., Daemen, M.J., de Muinck, E.D., Mooy, C.M., de Jong, P.T., 2000. The APO(*)E3-Leiden mouse as an animal model for basal laminar deposit. *Br. J. Ophthalmol.* 84, 1415–1419.
- Kliffen, M., Sharma, H.S., Mooy, C.M., Kerkvliet, S., de Jong, P.T., 1997. Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *Br. J. Ophthalmol.* 81, 154–162.
- Klionsky, D.J., Cuervo, A.M., Dunn, W.A., Jr, Levine, B., van der Klei, I., Seglen, P.O., 2007. How shall I eat thee? *Autophagy* 3, 413–416.

- Kohno, H., Maeda, T., Perusek, L., Pearlman, E., Maeda, A., 2014. CCL3 Production by Microglial Cells Modulates Disease Severity in Murine Models of Retinal Degeneration. *J. Immunol.* 192, 3816–3827. doi:10.4049/jimmunol.1301738
- Kolb, H., Linberg, K.A., Fisher, S.K., 1992. Neurons of the human retina: a Golgi study. *J. Comp. Neurol.* 318, 147–187. doi:10.1002/cne.903180204
- Kowluru, R.A., 2001. Diabetes-induced elevations in retinal oxidative stress, protein kinase C and nitric oxide are interrelated. *Acta Diabetol.* 38, 179–185.
- Kowluru, R.A., Engerman, R.L., Kern, T.S., 1999. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia. VI. Comparison of retinal and cerebral cortex metabolism, and effects of antioxidant therapy. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 371–378.
- Kowluru, R.A., Kern, T.S., Engerman, R.L., 1997. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia. IV. Antioxidant defense system. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 587–592.
- Kowluru, R.A., Odenbach, S., 2004. Effect of long-term administration of alpha-lipoic acid on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats. *Diabetes* 53, 3233–3238.
- Kowluru, R.A., Zhong, Q., Santos, J.M., Thandampallayam, M., Putt, D., Gierhart, D.L., 2014. Beneficial effects of the nutritional supplements on the development of diabetic retinopathy. *Nutr. Metab.* 11, 8. doi:10.1186/1743-7075-11-8
- Koya, D., King, G.L., 1998. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 47, 859–866.
- Kuroki, T., Inoguchi, T., Umeda, F., Nawata, H., 1998. Effect of eicosapentaenoic acid on glucose-induced diacylglycerol synthesis in cultured bovine aortic endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 473–477. doi:10.1006/bbrc.1998.8814
- Kwak, N., Okamoto, N., Wood, J.M., Campochiaro, P.A., 2000. VEGF is major stimulator in model of choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 3158–3164.
- Lachapelle, P., Benoit, J., Little, J.M., Faubert, J., 1989. The diagnostic use of the second oscillatory potential in clinical electroretinography. *Doc. Ophthalmol.* 73, 327–336. doi:10.1007/BF00154488
- Lally, D.R., Gerstenblith, A.T., Regillo, C.D., 2012. Preferred therapies for neovascular age-related macular degeneration. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 23, 182–188. doi:10.1097/ICU.0b013e328352411c
- Lambert, V., Lecomte, J., Hansen, S., Blacher, S., Gonzalez, M.-L.A., Struman, I., Sounni, N.E., Rozet, E., de Tullio, P., Foidart, J.M., Rakic, J.-M., Noel, A., 2013. Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. *Nat. Protoc.* 8, 2197–2211. doi:10.1038/nprot.2013.135
- Lambert, V., Munaut, C., Noël, A., Frankenne, F., Bajou, K., Gerard, R., Carmeliet, P., Defresne, M.P., Foidart, J.M., Rakic, J.M., 2001. Influence of plasminogen activator inhibitor type 1 on choroidal neovascularization. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 15, 1021–1027.
- Lambert, V., Wielockx, B., Munaut, C., Galopin, C., Jost, M., Itoh, T., Werb, Z., Baker, A., Libert, C., Krell, H.-W., Foidart, J.-M., Noël, A., Rakic, J.-M., 2003. MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17, 2290–2292. doi:10.1096/fj.03-0113fje

- Langmann, T., 2007. Microglia activation in retinal degeneration. *J. Leukoc. Biol.* 81, 1345–1351. doi:10.1189/jlb.0207114
- Lassègue, B., Clempus, R.E., 2003. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R277–297. doi:10.1152/ajpregu.00758.2002
- Leduc, M., Kermorvant-Duchemin, E., Checchin, D., Sennlaub, F., Chemtob, S., 2007. [Hypercapnia- and trans-arachidonic acid-induced retinal microvascular degeneration: implications in the genesis of retinopathy of prematurity]. *Médecine Sci.* MS 23, 939–943. doi:10.1051/medsci/20072311939
- Lee, Y.S., Amadi-Obi, A., Yu, C.-R., Egwuagu, C.E., 2011. Retinal cells suppress intraocular inflammation (uveitis) through production of interleukin-27 and interleukin-10. *Immunology* 132, 492–502. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03379.x
- Le Goff, M.M., Lu, H., Ugarte, M., Henry, S., Takanosu, M., Mayne, R., Bishop, P.N., 2012. The vitreous glycoprotein opticin inhibits preretinal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 228–234. doi:10.1167/iovs.11-8514
- Li, F., Chen, H., Anderson, R.E., 2001. Biosynthesis of docosahexaenoate-containing glycerolipid molecular species in the retina. *J. Mol. Neurosci.* MN 16, 205–214; discussion 215–221. doi:10.1385/JMN:16:2-3:205
- Li, J., Li, F.R., Wei, D., Jia, W., Kang, J.X., Stefanovic-Racic, M., Dai, Y., Zhao, A.Z., 2014. Endogenous ω -3 polyunsaturated fatty acid production confers resistance to obesity, dyslipidemia, and diabetes in mice. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 28, 1316–1328. doi:10.1210/me.2014-1011
- Lin, Q., Ruuska, S.E., Shaw, N.S., Dong, D., Noy, N., 1999. Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor α . *Biochemistry (Mosc.)* 38, 185–190. doi:10.1021/bi9816094
- Litman, B.J., Mitchell, D.C., 1996. A role for phospholipid polyunsaturation in modulating membrane protein function. *Lipids* 31 Suppl, S193–197.
- Litman, B.J., Niu, S.L., Polozova, A., Mitchell, D.C., 2001. The role of docosahexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways: visual transduction. *J. Mol. Neurosci.* MN 16, 237–242; discussion 279–284. doi:10.1385/JMN:16:2-3:237
- Liu, J., Jha, P., Lyzogubov, V.V., Tytarenko, R.G., Bora, N.S., Bora, P.S., 2011. Relationship between complement membrane attack complex, chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) and vascular endothelial growth factor in mouse model of laser-induced choroidal neovascularization. *J. Biol. Chem.* 286, 20991–21001. doi:10.1074/jbc.M111.226266
- Losiewicz, M.K., Fort, P.E., 2011. Diabetes impairs the neuroprotective properties of retinal alpha-crystallins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 5034–5042. doi:10.1167/iovs.10-6931
- Lyzogubov, V.V., Tytarenko, R.G., Jha, P., Liu, J., Bora, N.S., Bora, P.S., 2010. Role of ocular complement factor H in a murine model of choroidal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 177, 1870–1880. doi:10.2353/ajpath.2010.091168
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., 1995. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.* 1, 1155–1161.

- Malek, G., Johnson, L.V., Mace, B.E., Saloupis, P., Schmechel, D.E., Rickman, D.W., Toth, C.A., Sullivan, P.M., Bowes Rickman, C., 2005. Apolipoprotein E allele-dependent pathogenesis: a model for age-related retinal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11900–11905. doi:10.1073/pnas.0503015102
- Mamikutty, N., Thent, Z.C., Sapri, S.R., Sahrudin, N.N., Mohd Yusof, M.R., Haji Suhaimi, F., 2014. The Establishment of Metabolic Syndrome Model by Induction of Fructose Drinking Water in Male Wistar Rats. *BioMed Res. Int.* 2014. doi:10.1155/2014/263897
- Mares-Perlman, J.A., Brady, W.E., Klein, R., VandenLangenberg, G.M., Klein, B.E., Palta, M., 1995. Dietary fat and age-related maculopathy. *Arch. Ophthalmol.* 113, 743–748.
- Markovets, A.M., Saprunova, V.B., Zhdankina, A.A., Fursova, A.Z., Bakeeva, L.E., Kolosova, N.G., 2011. Alterations of retinal pigment epithelium cause AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats. *Aging* 3, 44–54.
- Martinez, F.J., Rizza, R.A., Romero, J.C., 1994. High-fructose feeding elicits insulin resistance, hyperinsulinism, and hypertension in normal mongrel dogs. *Hypertension* 23, 456–463.
- Martínez, M., Vázquez, E., García-Silva, M.T., Manzanares, J., Bertran, J.M., Castelló, F., Mougán, I., 2000. Therapeutic effects of docosahexaenoic acid ethyl ester in patients with generalized peroxisomal disorders. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 376S–85S.
- Martín-Merino, E., Fortuny, J., Rivero-Ferrer, E., García-Rodríguez, L.A., 2014. Incidence of retinal complications in a cohort of newly diagnosed diabetic patients. *PloS One* 9, e100283. doi:10.1371/journal.pone.0100283
- Masilamoni, J.G., Jesudason, E.P., Bharathi, S.N., Jayakumar, R., 2005. The protective effect of alpha-crystallin against acute inflammation in mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1740, 411–420. doi:10.1016/j.bbdis.2004.11.002
- Masuzaki, H., Ogawa, Y., Isse, N., Satoh, N., Okazaki, T., Shigemoto, M., Mori, K., Tamura, N., Hosoda, K., Yoshimasa, Y., 1995. Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 44, 855–858.
- Ma, W., Zhao, L., Fontainhas, A.M., Fariss, R.N., Wong, W.T., 2009. Microglia in the mouse retina alter the structure and function of retinal pigmented epithelial cells: a potential cellular interaction relevant to AMD. *PloS One* 4, e7945. doi:10.1371/journal.pone.0007945
- Mayer-Davis, E.J., Bell, R.A., Reboussin, B.A., Rushing, J., Marshall, J.A., Hamman, R.F., 1998. Antioxidant nutrient intake and diabetic retinopathy: the San Luis Valley Diabetes Study. *Ophthalmology* 105, 2264–2270. doi:10.1016/S0161-6420(98)91227-1
- Mayes, P.A., 1993. Intermediary metabolism of fructose. *Am. J. Clin. Nutr.* 58, 754S–765S.
- McCarty, M.F., 2005. The putative therapeutic value of high-dose selenium in proliferative retinopathies may reflect down-regulation of VEGF production by the hypoxic retina. *Med. Hypotheses* 64, 159–161. doi:10.1016/j.mehy.2002.11.003
- McGarry, J.D., 1994. Disordered metabolism in diabetes: have we underemphasized the fat component? *J. Cell. Biochem.* 55 Suppl, 29–38.
- McLeod, D.S., Lutty, G.A., 1994. High-resolution histologic analysis of the human choroidal vasculature. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 3799–3811.
- Merle, B.M.J., Benlian, P., Puche, N., Bassols, A., Delcourt, C., Souied, E.H., Nutritional AMD Treatment 2 Study Group, 2014. Circulating omega-3 Fatty acids and neovascular

- age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 2010–2019. doi:10.1167/iovs.14-13916
- Mettu, P.S., Wielgus, A.R., Ong, S.S., Cousins, S.W., 2012. Retinal pigment epithelium response to oxidant injury in the pathogenesis of early age-related macular degeneration. *Mol. Aspects Med.* 33, 376–398. doi:10.1016/j.mam.2012.04.006
- Miao, X., Sun, W., Miao, L., Fu, Y., Wang, Y., Su, G., Liu, Q., 2013. Zinc and diabetic retinopathy. *J. Diabetes Res.* 2013, 425854. doi:10.1155/2013/425854
- Micallef, M.A., Munro, I.A., Garg, M.L., 2009. An inverse relationship between plasma n-3 fatty acids and C-reactive protein in healthy individuals. *Eur. J. Clin. Nutr.* 63, 1154–1156. doi:10.1038/ejcn.2009.20
- Miceli, M.V., Liles, M.R., Newsome, D.A., 1994. Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis. *Exp. Cell Res.* 214, 242–249. doi:10.1006/excr.1994.1254
- Miller, J.W., 2013. Age-related macular degeneration revisited--piecing the puzzle: the LXIX Edward Jackson memorial lecture. *Am. J. Ophthalmol.* 155, 1–35.e13. doi:10.1016/j.ajo.2012.10.018
- Mitchell, P., Wang, J.J., 1999. Diabetes, fasting blood glucose and age-related maculopathy: The Blue Mountains Eye Study. *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.* 27, 197–199.
- Moghaddam-Taaheri, S., Agarwal, M., Amaral, J., Fedorova, I., Agrón, E., Salem, N., Jr, Chew, E., Becerra, S.P., 2011. Effects of Docosahexaenoic Acid in Preventing Experimental Choroidal Neovascularization in Rodents. *J. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2. doi:10.4172/2155-9570.1000187
- Mohammad, G., Kowluru, R.A., 2011. Novel role of mitochondrial matrix metalloproteinase-2 in the development of diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 3832–3841. doi:10.1167/iovs.10-6368
- Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., Cheetham, C.H., Earley, A.R., Barnett, A.H., Prins, J.B., O'Rahilly, S., 1997. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387, 903–908. doi:10.1038/43185
- Moore, M.C., Davis, S.N., Mann, S.L., Cherrington, A.D., 2001. Acute fructose administration improves oral glucose tolerance in adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 24, 1882–1887.
- Morrison, W.R., Smith, L.M., 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5, 600–608.
- Moustafa, S.A., 2004. Zinc might protect oxidative changes in the retina and pancreas at the early stage of diabetic rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 201, 149–155. doi:10.1016/j.taap.2004.05.014
- Mueller, W.M., Gregoire, F.M., Stanhope, K.L., Mobbs, C.V., Mizuno, T.M., Warden, C.H., Stern, J.S., Havel, P.J., 1998. Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology* 139, 551–558. doi:10.1210/endo.139.2.5716
- Mullur, R., Liu, Y.-Y., Brent, G.A., 2014. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* 94, 355–382. doi:10.1152/physrev.00030.2013
- Nakagawa, T., Hu, H., Zharikov, S., Tuttle, K.R., Short, R.A., Glushakova, O., Ouyang, X., Feig, D.I., Block, E.R., Herrera-Acosta, J., Patel, J.M., Johnson, R.J., 2006. A causal role

- for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 290, F625–631. doi:10.1152/ajprenal.00140.2005
- Newman, L.A., Walker, M.T., Brown, R.L., Cronin, T.W., Robinson, P.R., 2003. Melanopsin forms a functional short-wavelength photopigment. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 12734–12738. doi:10.1021/bi035418z
- Noël, A., Jost, M., Lambert, V., Lecomte, J., Rakic, J.-M., 2007. Anti-angiogenic therapy of exudative age-related macular degeneration: current progress and emerging concepts. *Trends Mol. Med.* 13, 345–352. doi:10.1016/j.molmed.2007.06.005
- Nomura, K., Yamanouchi, T., 2012. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *J. Nutr. Biochem.* 23, 203–208. doi:10.1016/j.jnutbio.2011.09.006
- Nozaki, M., Raisler, B.J., Sakurai, E., Sarma, J.V., Barnum, S.R., Lambris, J.D., Chen, Y., Zhang, K., Ambati, B.K., Baffi, J.Z., Ambati, J., 2006. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2328–2333. doi:10.1073/pnas.0408835103
- Obrosova, I.G., Fathallah, L., Liu, E., Nourooz-Zadeh, J., 2003. Early oxidative stress in the diabetic kidney: effect of DL-alpha-lipoic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 186–195.
- Oh, P.C., Koh, K.K., Sakuma, I., Lim, S., Lee, Y., Lee, S., Lee, K., Han, S.H., Shin, E.K., 2014. Omega-3 fatty acid therapy dose-dependently and significantly decreased triglycerides and improved flow-mediated dilation, however, did not significantly improve insulin sensitivity in patients with hypertriglyceridemia. *Int. J. Cardiol.* doi:10.1016/j.ijcard.2014.07.075
- Onuki, Y., Morishita, M., Takayama, K., Tokiwa, S., Chiba, Y., Isowa, K., Nagai, T., 2000. In vivo effects of highly purified docosahexaenoic acid on rectal insulin absorption. *Int. J. Pharm.* 198, 147–156.
- Packer, L., Witt, E.H., Tritschler, H.J., 1995. alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 227–250.
- Paniagua, J.A., Pérez-Martínez, P., Gjelstad, I.M.F., Tierney, A.C., Delgado-Lista, J., Defoort, C., Blaak, E.E., Riserus, U., Drevon, C.A., Kiec-Wilk, B., Lovegrove, J.A., Roche, H.M., López-Miranda, J., LIPGENE Study Investigators, 2011. A low-fat high-carbohydrate diet supplemented with long-chain n-3 PUFA reduces the risk of the metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 218, 443–450. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.003
- Pascolini, D., Mariotti, S.P., 2012. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br. J. Ophthalmol.* 96, 614–618. doi:10.1136/bjophthalmol-2011-300539
- Peppas, M., Vlassara, H., 2005. Advanced glycation end products and diabetic complications: a general overview. *Horm. Athens Greece* 4, 28–37.
- Pérez-Matute, P., Pérez-Echarri, N., Martínez, J.A., Martí, A., Moreno-Aliaga, M.J., 2007. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha. *Br. J. Nutr.* 97, 389–398. doi:10.1017/S0007114507207627
- Perry, V.H., Gordon, S., 1988. Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci.* 11, 273–277.

- Phillis, J.W., Horrocks, L.A., Farooqui, A.A., 2006. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxigenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res. Rev.* 52, 201–243. doi:10.1016/j.brainresrev.2006.02.002
- Picard, E., Houssier, M., Bujold, K., Sapieha, P., Lubell, W., Dorfman, A., Racine, J., Hardy, P., Febbraio, M., Lachapelle, P., Ong, H., Sennlaub, F., Chemtob, S., 2010. CD36 plays an important role in the clearance of oxLDL and associated age-dependent sub-retinal deposits. *Aging* 2, 981–989.
- Postel, E.A., Agarwal, A., Caldwell, J., Gallins, P., Toth, C., Schmidt, S., Scott, W.K., Hauser, M.A., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., 2006. Complement factor H increases risk for atrophic age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 113, 1504–1507. doi:10.1016/j.optha.2006.02.049
- Quaranta, L., Riva, I., Floriani, I., 2014. Ginkgo biloba extract improves visual field damage in some patients affected by normal-tension glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 2417. doi:10.1167/iovs.14-13942
- Querques, G., Souied, E.H., 2014. The role of omega-3 and micronutrients in age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* doi:10.1016/j.survophthal.2014.01.001
- Rakic, J.-M., Lambert, V., Devy, L., Luttun, A., Carmeliet, P., Claes, C., Nguyen, L., Foidart, J.-M., Noël, A., Munaut, C., 2003. Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 3186–3193.
- Ramel, A., Martinez, J.A., Kiely, M., Bandarra, N.M., Thorsdottir, I., 2010. Effects of weight loss and seafood consumption on inflammation parameters in young, overweight and obese European men and women during 8 weeks of energy restriction. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64, 987–993. doi:10.1038/ejcn.2010.99
- Ramsey, D.J., Ramsey, K.M., Vavvas, D.G., 2013. Genetic advances in ophthalmology: the role of melanopsin-expressing, intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the circadian organization of the visual system. *Semin. Ophthalmol.* 28, 406–421. doi:10.3109/08820538.2013.825294
- Rao, N.A., Kimoto, T., Zamir, E., Giri, R., Wang, R., Ito, S., Pararajasegaram, G., Read, R.W., Wu, G.-S., 2003. Pathogenic role of retinal microglia in experimental uveoretinitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 22–31.
- Raoul, W., Auvynet, C., Camelo, S., Guillonnet, X., Feumi, C., Combadière, C., Sennlaub, F., 2010. CCL2/CCR2 and CX3CL1/CX3CR1 chemokine axes and their possible involvement in age-related macular degeneration. *J. Neuroinflammation* 7, 87. doi:10.1186/1742-2094-7-87
- Rattner, A., Nathans, J., 2005. The genomic response to retinal disease and injury: evidence for endothelin signaling from photoreceptors to glia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 4540–4549. doi:10.1523/JNEUROSCI.0492-05.2005
- Reaven, G.M., 1988. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595–1607.
- Reaven, G.M., 1988. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595–1607.
- Rees, D.A., Alcolado, J.C., 2005. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 22, 359–370. doi:10.1111/j.1464-5491.2005.01499.x

- Reynolds, R., Rosner, B., Seddon, J.M., 2013. Dietary omega-3 fatty acids, other fat intake, genetic susceptibility, and progression to incident geographic atrophy. *Ophthalmology* 120, 1020–1028. doi:10.1016/j.opht.2012.10.020
- Rivera, A., Fisher, S.A., Fritsche, L.G., Keilhauer, C.N., Lichtner, P., Meitinger, T., Weber, B.H.F., 2005. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3227–3236. doi:10.1093/hmg/ddi353
- Rizkalla, S.W., Boillot, J., Tricottet, V., Fontvieille, A.M., Luo, J., Salzman, J.L., Camilleri, J.P., Slama, G., 1993. Effects of chronic dietary fructose with and without copper supplementation on glycaemic control, adiposity, insulin binding to adipocytes and glomerular basement membrane thickness in normal rats. *Br. J. Nutr.* 70, 199–209.
- Robinson, L.E., Mazurak, V.C., 2013. N-3 polyunsaturated fatty acids: relationship to inflammation in healthy adults and adults exhibiting features of metabolic syndrome. *Lipids* 48, 319–332. doi:10.1007/s11745-013-3774-6
- Robinson, R., Barathi, V.A., Chaurasia, S.S., Wong, T.Y., Kern, T.S., 2012. Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals. *Dis. Model. Mech.* 5, 444–456. doi:10.1242/dmm.009597
- Romaniuk, D., Kimsa, M.W., Strzalka-Mrozik, B., Kimsa, M.C., Kabiesz, A., Romaniuk, W., Mazurek, U., 2013. Gene Expression of *IGF1*, *IGF1R*, and *IGFBP3* in Epiretinal Membranes of Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy: Preliminary Study. *Mediators Inflamm.* 2013, e986217. doi:10.1155/2013/986217
- Romeo, G.R., Lee, J., Shoelson, S.E., 2012. Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation--mechanisms and therapeutic targets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1771–1776. doi:10.1161/ATVBAHA.111.241869
- Rossmesl, M., Medrikova, D., van Schothorst, E.M., Pavlisova, J., Kuda, O., Hensler, M., Bardova, K., Flachs, P., Stankova, B., Vecka, M., Tvrzicka, E., Zak, A., Keijer, J., Kopecky, J., 2014. Omega-3 phospholipids from fish suppress hepatic steatosis by integrated inhibition of biosynthetic pathways in dietary obese mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 267–278. doi:10.1016/j.bbali.2013.11.010
- Rucker, R., Storms, D., 2002. Interspecies comparisons of micronutrient requirements: metabolic vs. absolute body size. *J. Nutr.* 132, 2999–3000.
- Rudolf, M., Winkler, B., Aherrahou, Z., Doebling, L.C., Kaczmarek, P., Schmidt-Erfurth, U., 2005. Increased expression of vascular endothelial growth factor associated with accumulation of lipids in Bruch's membrane of LDL receptor knockout mice. *Br. J. Ophthalmol.* 89, 1627–1630. doi:10.1136/bjo.2005.071183
- Saari, J.C., 2001. The sights along route 65. *Nat. Genet.* 29, 8–9. doi:10.1038/ng0901-8
- Salem, N., Jr, Litman, B., Kim, H.Y., Gawrisch, K., 2001. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* 36, 945–959.
- Salomon, R.G., Hong, L., Hollyfield, J.G., 2011. Discovery of carboxyethylpyrroles (CEPs): critical insights into AMD, autism, cancer, and wound healing from basic research on the chemistry of oxidized phospholipids. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 1803–1816. doi:10.1021/tx200206v
- Samardzija, M., Caprara, C., Heynen, S.R., Willcox DeParis, S., Meneau, I., Traber, G.L., Agca, C., von Lintig, J., Grimm, C., 2014. A mouse model for studying cone photoreceptor pathologies. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* doi:10.1167/iovs.14-14789

- Samardzija, M., Wariwoda, H., Immsand, C., Huber, P., Heynen, S.R., Gubler, A., Grimm, C., 2012. Activation of survival pathways in the degenerating retina of rd10 mice. *Exp. Eye Res.* 99, 17–26. doi:10.1016/j.exer.2012.04.004
- SanGiovanni, J.P., Agrón, E., Meleth, A.D., Reed, G.F., Sperduto, R.D., Clemons, T.E., Chew, E.Y., Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2009. {omega}-3 Long-chain polyunsaturated fatty acid intake and 12-y incidence of neovascular age-related macular degeneration and central geographic atrophy: AREDS report 30, a prospective cohort study from the Age-Related Eye Disease Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 90, 1601–1607. doi:10.3945/ajcn.2009.27594
- SanGiovanni, J.P., Berkey, C.S., Dwyer, J.T., Colditz, G.A., 2000a. Dietary essential fatty acids, long-chain polyunsaturated fatty acids, and visual resolution acuity in healthy fullterm infants: a systematic review. *Early Hum. Dev.* 57, 165–188.
- SanGiovanni, J.P., Chew, E.Y., 2005. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 24, 87–138. doi:10.1016/j.preteyeres.2004.06.002
- SanGiovanni, J.P., Chew, E.Y., Clemons, T.E., Davis, M.D., Ferris, F.L., Gensler, G.R., Kurinij, N., Lindblad, A.S., Milton, R.C., Seddon, J.M., Sperduto, R.D., Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2007. The relationship of dietary lipid intake and age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS Report No. 20. *Arch. Ophthalmol.* 125, 671–679. doi:10.1001/archophth.125.5.671
- SanGiovanni, J.P., Parra-Cabrera, S., Colditz, G.A., Berkey, C.S., Dwyer, J.T., 2000b. Meta-analysis of dietary essential fatty acids and long-chain polyunsaturated fatty acids as they relate to visual resolution acuity in healthy preterm infants. *Pediatrics* 105, 1292–1298.
- Sapieha, P., Chen, J., Stahl, A., Seaward, M.R., Favazza, T.L., Juan, A.M., Hatton, C.J., Joyal, J.-S., Krah, N.M., Dennison, R.J., Tang, J., Kern, T.S., Akula, J.D., Smith, L.E.H., 2012. Omega-3 polyunsaturated fatty acids preserve retinal function in type 2 diabetic mice. *Nutr. Diabetes* 2, e36. doi:10.1038/nutd.2012.10
- Sato, A., Kawano, H., Notsu, T., Ohta, M., Nakakuki, M., Mizuguchi, K., Itoh, M., Suganami, T., Ogawa, Y., 2010. Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. *Diabetes* 59, 2495–2504. doi:10.2337/db09-1554
- Sato, Y., Ito, T., Udaka, N., Kanisawa, M., Noguchi, Y., Cushman, S.W., Satoh, S., 1996. Immunohistochemical localization of facilitated-diffusion glucose transporters in rat pancreatic islets. *Tissue Cell* 28, 637–643.
- Scarpace, P.J., Zhang, Y., 2007. Elevated leptin: consequence or cause of obesity? *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 12, 3531–3544.
- Schmidt, S., Hauser, M.A., Scott, W.K., Postel, E.A., Agarwal, A., Gallins, P., Wong, F., Chen, Y.S., Spencer, K., Schnetz-Boutaud, N., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., 2006. Cigarette smoking strongly modifies the association of LOC387715 and age-related macular degeneration. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 852–864. doi:10.1086/503822
- Schnebelen, C., Fourgeux, C., Pasquis, B., Creuzot-Garcher, C.P., Bron, A.M., Bretillon, L., Acar, N., 2011. Dietary polyunsaturated fatty acids reduce retinal stress induced by an elevation of intraocular pressure in rats. *Nutr. Res.* 31, 286–295. doi:10.1016/j.nutres.2011.03.011

- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Jr, Seeley, R.J., Baskin, D.G., 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661–671. doi:10.1038/35007534
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J., Baskin, D.G., 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661–671. doi:10.1038/35007534
- Sébédio, J.L., Astorg, P.O., Septier, C., Grandgirard, A., 1987. Quantitative analyses of polar components in frying oils by the iatrosan thin-layer chromatography-flame ionization detection technique. *J. Chromatogr.* 405, 371–378.
- Seddon, J.M., Cote, J., Davis, N., Rosner, B., 2003. Progression of age-related macular degeneration: association with body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio. *Arch. Ophthalmol.* 121, 785–792. doi:10.1001/archophth.121.6.785
- Seddon, J.M., George, S., Rosner, B., 2006. Cigarette smoking, fish consumption, omega-3 fatty acid intake, and associations with age-related macular degeneration: the US Twin Study of Age-Related Macular Degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 124, 995–1001. doi:10.1001/archophth.124.7.995
- Seddon, J.M., Rosner, B., Sperduto, R.D., Yannuzzi, L., Haller, J.A., Blair, N.P., Willett, W., 2001a. Dietary fat and risk for advanced age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 119, 1191–1199.
- Seddon, J.M., Willett, W.C., Speizer, F.E., Hankinson, S.E., 1996. A prospective study of cigarette smoking and age-related macular degeneration in women. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 276, 1141–1146.
- Seeliger, M.W., Brombas, A., Weiler, R., Humphries, P., Knop, G., Tanimoto, N., Müller, F., 2011. Modulation of rod photoreceptor output by HCN1 channels is essential for regular mesopic cone vision. *Nat. Commun.* 2, 532. doi:10.1038/ncomms1540
- Seeliger, M.W., Grimm, C., Ståhlberg, F., Friedburg, C., Jaissle, G., Zrenner, E., Remé, C.E., Guo, H., Humphries, P., Hofmann, F., Biel, M., Fariss, R.N., Redmond, T.M., Wenzel, A., 2001. New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Nat. Genet.* 29, 70–74. doi:10.1038/ng712
- Semkova, I., Kociok, N., Karagiannis, D., Nischt, R., Smyth, N., Paulsson, M., Strauß, O., Joussen, A.M., 2014a. Anti-angiogenic effect of the basement membrane protein nidogen-1 in a mouse model of choroidal neovascularization. *Exp. Eye Res.* 118, 80–88. doi:10.1016/j.exer.2013.11.006
- Semo, M., Gias, C., Ahmado, A., Vugler, A., 2014. A role for the ciliary marginal zone in the melanopsin-dependent intrinsic pupillary light reflex. *Exp. Eye Res.* 119, 8–18. doi:10.1016/j.exer.2013.11.013
- Sennlaub, F., Auvynet, C., Calippe, B., Lavalette, S., Poupel, L., Hu, S.J., Dominguez, E., Camelo, S., Levy, O., Guyon, E., Saederup, N., Charo, I.F., Rooijen, N.V., Nandrot, E., Bourges, J.-L., Behar-Cohen, F., Sahel, J.-A., Guillonneau, X., Raoul, W., Combadiere, C., 2013. CCR2(+) monocytes infiltrate atrophic lesions in age-related macular disease and mediate photoreceptor degeneration in experimental subretinal inflammation in Cx3cr1 deficient mice. *EMBO Mol. Med.* 5, 1775–1793. doi:10.1002/emmm.201302692
- Serhan, C.N., 2014. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 510, 92–101. doi:10.1038/nature13479
- Serhan, C.N., Arita, M., Hong, S., Gotlinger, K., 2004. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids* 39, 1125–1132.

- Serhan, C.N., Chiang, N., Van Dyke, T.E., 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 349–361. doi:10.1038/nri2294
- Serini, S., Fasano, E., Piccioni, E., Cittadini, A.R.M., Calviello, G., 2011. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and the paradox of their health benefits and potential harmful effects. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 2093–2105. doi:10.1021/tx200314p
- Shao, Z., Fu, Z., Stahl, A., Joyal, J.-S., Hatton, C., Juan, A., Hurst, C., Evans, L., Cui, Z., Pei, D., Gong, Y., Xu, D., Tian, K., Bogardus, H., Edin, M.L., Lih, F., Sapieha, P., Chen, J., Panigrahy, D., Hellstrom, A., Zeldin, D.C., Smith, L.E.H., 2014. Cytochrome P450 2C8 ω 3-long-chain polyunsaturated fatty acid metabolites increase mouse retinal pathologic neovascularization--brief report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 581–586. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302927
- Shapiro, A., Mu, W., Roncal, C., Cheng, K.-Y., Johnson, R.J., Scarpace, P.J., 2008. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, R1370–1375. doi:10.1152/ajpregu.00195.2008
- Sharpe, L.T., Stockman, A., 1999. Rod pathways: the importance of seeing nothing. *Trends Neurosci.* 22, 497–504.
- Shen, J., Ma, Q., Shen, S., Shen, S., Xu, G.-T., Das, U.N., 2013. Effect of α -linolenic acid on streptozotocin-induced diabetic retinopathy indices in vivo. *Arch. Med. Res.* 44, 514–520. doi:10.1016/j.arcmed.2013.09.010
- Shoji, T., Sakurai, Y., Sato, H., Chihara, E., Takeuchi, M., 2011. Do type 2 diabetes patients without diabetic retinopathy or subjects with impaired fasting glucose have impaired colour vision? The Okubo Color Study Report. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 28, 865–871. doi:10.1111/j.1464-5491.2011.03290.x
- Sinha, D., Klise, A., Sergeev, Y., Hose, S., Bhutto, I.A., Hackler, L., Malpic-Llanos, T., Samtani, S., Grebe, R., Goldberg, M.F., Hejtmancik, J.F., Nath, A., Zack, D.J., Fariss, R.N., McLeod, D.S., Sundin, O., Broman, K.W., Lutty, G.A., Zigler, J.S., 2008. betaA3/A1-crystallin in astroglial cells regulates retinal vascular remodeling during development. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 85–95. doi:10.1016/j.mcn.2007.08.016
- Smith, L.E.H., 2004. Pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Growth Horm. IGF Res. Off. J. Growth Horm. Res. Soc. Int. IGF Res. Soc.* 14 Suppl A, S140–144. doi:10.1016/j.ghir.2004.03.030
- Smith, L.E.H., 2005. IGF-1 and retinopathy of prematurity in the preterm infant. *Biol. Neonate* 88, 237–244. doi:10.1159/000087587
- Smith, W., Mitchell, P., Leeder, S.R., 2000. Dietary fat and fish intake and age-related maculopathy. *Arch. Ophthalmol.* 118, 401–404.
- Sneddon, A.A., Tsofliou, F., Fyfe, C.L., Matheson, I., Jackson, D.M., Horgan, G., Winzell, M.S., Wahle, K.W.J., Ahren, B., Williams, L.M., 2008. Effect of a conjugated linoleic acid and omega-3 fatty acid mixture on body composition and adiponectin. *Obes. Silver Spring Md* 16, 1019–1024. doi:10.1038/oby.2008.41
- Soares, T.S., Piovesan, C.H., Gustavo, A. da S., Macagnan, F.E., Bodanese, L.C., Feoli, A.M.P., 2014. Alimentary Habits, Physical Activity, and Framingham Global Risk Score in Metabolic Syndrome. *Arq. Bras. Cardiol.* 102, 374–382. doi:10.5935/abc.20140029

- Sobrin, L., Seddon, J.M., 2014. Nature and nurture- genes and environment- predict onset and progression of macular degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 40C, 1–15. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.12.004
- Soriguer, F., Goday, A., Bosch-Comas, A., Bordiú, E., Calle-Pascual, A., Carmena, R., Casamitjana, R., Castaño, L., Castell, C., Catalá, M., Delgado, E., Franch, J., Gaztambide, S., Gibés, J., Gomis, R., Gutiérrez, G., López-Alba, A., Martínez-Larrad, M.T., Menéndez, E., Mora-Peces, I., Ortega, E., Pascual-Manich, G., Rojo-Martínez, G., Serrano-Rios, M., Valdés, S., Vázquez, J.A., Vendrell, J., 2012. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia* 55, 88–93. doi:10.1007/s00125-011-2336-9
- Souied, E.H., Delcourt, C., Querques, G., Bassols, A., Merle, B., Zourdani, A., Smith, T., Benlian, P., Nutritional AMD Treatment 2 Study Group, 2013. Oral docosahexaenoic acid in the prevention of exudative age-related macular degeneration: the Nutritional AMD Treatment 2 study. *Ophthalmology* 120, 1619–1631. doi:10.1016/j.opthta.2013.01.005
- Spadea, L., Balestrazzi, E., 2001. Treatment of vascular retinopathies with Pycnogenol. *Phytother. Res. PTR* 15, 219–223.
- Sparrow, J.R., Boulton, M., 2005. RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp. Eye Res.* 80, 595–606. doi:10.1016/j.exer.2005.01.007
- Stitt, A., Gardiner, T.A., Anderson, N.L., Canning, P., Frizzell, N., Duffy, N., Boyle, C., Januszewski, A.S., Chachich, M., Baynes, J.W., Thorpe, S.R., 2002. The AGE Inhibitor Pyridoxamine Inhibits Development of Retinopathy in Experimental. *Diabetes* 51, 2826–2832. doi:10.2337/diabetes.51.9.2826
- Suñer, I.J., Espinosa-Heidmann, D.G., Marin-Castano, M.E., Hernandez, E.P., Pereira-Simon, S., Cousins, S.W., 2004. Nicotine increases size and severity of experimental choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 311–317.
- Szmajda, B.A., Grünert, U., Martin, P.R., 2008. Retinal ganglion cell inputs to the koniocellular pathway. *J. Comp. Neurol.* 510, 251–268. doi:10.1002/cne.21783
- Szwergold, B.S., Kappler, F., Brown, T.R., 1990. Identification of fructose 3-phosphate in the lens of diabetic rats. *Science* 247, 451–454.
- Takada, Y., Ogata, N., Ohkuma, H., Uyama, M., 1993. [Age-related changes in Bruch's membrane of the senescence accelerated mouse]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 97, 595–601.
- Taltavull, N., Muñoz-Cortés, M., Lluís, L., Jové, M., Fortuño, A., Molinar-Toribio, E., Torres, J.L., Pazos, M., Medina, I., Nogués, M.R., 2014. Eicosapentaenoic acid/docosahexaenoic acid 1:1 ratio improves histological alterations in obese rats with metabolic syndrome. *Lipids Health Dis.* 13, 31. doi:10.1186/1476-511X-13-31
- Tappy, L., Lê, K.-A., 2012. Does fructose consumption contribute to non-alcoholic fatty liver disease? *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 36, 554–560. doi:10.1016/j.clinre.2012.06.005
- Tarr, J.M., Kaul, K., Chopra, M., Kohner, E.M., Chibber, R., 2013a. Pathophysiology of Diabetic Retinopathy. *ISRN Ophthalmol.* 2013, 343560. doi:10.1155/2013/343560
- Tate, D.J., Miceli, M.V., Newsome, D.A., 1997. Zinc induces catalase expression in cultured fetal human retinal pigment epithelial cells. *Curr. Eye Res.* 16, 1017–1023.

- Teerlink, T., Scheffer, P.G., Bakker, S.J.L., Heine, R.J., 2004. Combined data from LDL composition and size measurement are compatible with a discoid particle shape. *J. Lipid Res.* 45, 954–966. doi:10.1194/jlr.M300521-JLR200
- Teff, K.L., Elliott, S.S., Tschöp, M., Kieffer, T.J., Rader, D., Heiman, M., Townsend, R.R., Keim, N.L., D'Alessio, D., Havel, P.J., 2004. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2963–2972. doi:10.1210/jc.2003-031855
- Templeton, J.P., Wang, X., Freeman, N.E., Ma, Z., Lu, A., Hejtmancik, F., Geisert, E.E., 2013. A crystallin gene network in the mouse retina. *Exp. Eye Res.* 116, 129–140. doi:10.1016/j.exer.2013.08.001
- Thanos, S., Böhm, M.R.R., Meyer Zu Hörste, M., Prokosch-Willing, V., Hennig, M., Bauer, D., Heiligenhaus, A., 2014. Role of crystallins in ocular neuroprotection and axonal regeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 42C, 145–161. doi:10.1016/j.preteyeres.2014.06.004
- Thorburn, A.W., Storlien, L.H., Jenkins, A.B., Khouri, S., Kraegen, E.W., 1989. Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 1155–1163.
- Tinsley, F.C., Taicher, G.Z., Heiman, M.L., 2004. Evaluation of a Quantitative Magnetic Resonance Method for Mouse Whole Body Composition Analysis. *Obesity* 12, 150–160. doi:10.1038/oby.2004.20
- Tiruvalluru, M., Ananthmakula, P., Ayyalasomayajula, V., Nappanveetil, G., Ayyagari, R., Reddy, G.B., 2013. Vitamin A supplementation ameliorates obesity-associated retinal degeneration in WNIN/Ob rats. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 29, 298–304. doi:10.1016/j.nut.2012.06.006
- Tobe, T., Ortega, S., Luna, J.D., Ozaki, H., Okamoto, N., Derevjani, N.L., Vinore, S.A., Basilico, C., Campochiaro, P.A., 1998. Targeted disruption of the FGF2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model. *Am. J. Pathol.* 153, 1641–1646. doi:10.1016/S0002-9440(10)65753-7
- Topouzis, F., Anastasopoulos, E., Augood, C., Bentham, G.C., Chakravarthy, U., de Jong, P.T.V.M., Rahu, M., Seland, J., Soubrane, G., Tomazzoli, L., Vingerling, J.R., Vioque, J., Young, I.S., Fletcher, A.E., 2009. Association of diabetes with age-related macular degeneration in the EUREYE study. *Br. J. Ophthalmol.* 93, 1037–1041. doi:10.1136/bjo.2008.146316
- Trieschmann, M., van Kuijk, F.J.G.M., Alexander, R., Hermans, P., Luthert, P., Bird, A.C., Pauleikhoff, D., 2008. Macular pigment in the human retina: histological evaluation of localization and distribution. *Eye Lond. Engl.* 22, 132–137. doi:10.1038/sj.eye.6702780
- Tserentsoodol, N., Sztein, J., Campos, M., Gordiyenko, N.V., Fariss, R.N., Lee, J.W., Fliesler, S.J., Rodriguez, I.R., 2006. Uptake of cholesterol by the retina occurs primarily via a low density lipoprotein receptor-mediated process. *Mol. Vis.* 12, 1306–1318.
- Tuo, J., Bojanowski, C.M., Zhou, M., Shen, D., Ross, R.J., Rosenberg, K.I., Cameron, D.J., Yin, C., Kowalak, J.A., Zhuang, Z., Zhang, K., Chan, C.-C., 2007. Murine ccl2/cx3cr1 deficiency results in retinal lesions mimicking human age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 3827–3836. doi:10.1167/iov.07-0051
- Uauy, R., Hoffman, D.R., Peirano, P., Birch, D.G., Birch, E.E., 2001. Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids* 36, 885–895.

- Uauy, R., Mena, P., Rojas, C., 2000. Essential fatty acids in early life: structural and functional role. *Proc. Nutr. Soc.* 59, 3–15.
- Uchiki, T., Weikel, K.A., Jiao, W., Shang, F., Caceres, A., Pawlak, D., Handa, J.T., Brownlee, M., Nagaraj, R., Taylor, A., 2012. Glycation-altered proteolysis as a pathobiologic mechanism that links dietary glycemic index, aging, and age-related disease (in nondiabetics). *Aging Cell* 11, 1–13. doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00752.x
- Ufret-Vincenty, R.L., Aredo, B., Liu, X., McMahon, A., Chen, P.W., Sun, H., Niederkorn, J.Y., Kedzierski, W., 2010. Transgenic mice expressing variants of complement factor H develop AMD-like retinal findings. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 5878–5887. doi:10.1167/iovs.09-4457
- Vadalà, M., Anastasi, M., Lodato, G., Cillino, S., 2002. Electroretinographic oscillatory potentials in insulin-dependent diabetes patients: A long-term follow-up. *Acta Ophthalmol. Scand.* 80, 305–309. doi:10.1034/j.1600-0420.2002.800314.x
- Van der Schaft, T.L., Mooy, C.M., de Bruijn, W.C., de Jong, P.T., 1993. Early stages of age-related macular degeneration: an immunofluorescence and electron microscopy study. *Br. J. Ophthalmol.* 77, 657–661.
- Van Lookeren Campagne, M., LeCouter, J., Yaspan, B.L., Ye, W., 2014. Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities. *J. Pathol.* 232, 151–164. doi:10.1002/path.4266
- Vemuri, M., Kelley, D.S., Mackey, B.E., Rasooly, R., Bartolini, G., 2007. Docosahexaenoic Acid (DHA) But Not Eicosapentaenoic Acid (EPA) Prevents Trans-10, Cis-12 Conjugated Linoleic Acid (CLA)-Induced Insulin Resistance in Mice. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 5, 315–322. doi:10.1089/met.2007.0007
- Verginelli, F., Aru, F., Battista, P., Mariani-Costantini, R., 2009. Nutrigenetics in the Light of Human Evolution. *J. Nutr. Nutr.* 2, 91–102. doi:10.1159/000228251
- Vernay, M., Salanave, B., de Peretti, C., Druet, C., Malon, A., Deschamps, V., Hercberg, S., Castetbon, K., 2013. Metabolic syndrome and socioeconomic status in France: The French Nutrition and Health Survey (ENNS, 2006-2007). *Int. J. Public Health* 58, 855–864. doi:10.1007/s00038-013-0501-2
- Vlassara, H., Palace, M. r., 2002. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J. Intern. Med.* 251, 87–101. doi:10.1046/j.1365-2796.2002.00932.x
- Wachtmeister, L., Dowling, J.E., 1978. The oscillatory potentials of the mudpuppy retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 17, 1176–1188.
- Wang, N., Anderson, R.E., 1993. Synthesis of docosahexaenoic acid by retina and retinal pigment epithelium. *Biochemistry (Mosc.)* 32, 13703–13709.
- Wässle, H., Dacey, D.M., Haun, T., Haverkamp, S., Grünert, U., Boycott, B.B., 2000. The mosaic of horizontal cells in the macaque monkey retina: with a comment on biplexiform ganglion cells. *Vis. Neurosci.* 17, 591–608.
- Wässle, H., Heinze, L., Ivanova, E., Majumdar, S., Weiss, J., Harvey, R.J., Haverkamp, S., 2009. Glycinergic transmission in the Mammalian retina. *Front. Mol. Neurosci.* 2, 6. doi:10.3389/neuro.02.006.2009
- Wenzel, A., von Lintig, J., Oberhauser, V., Tanimoto, N., Grimm, C., Seeliger, M.W., 2007. RPE65 is essential for the function of cone photoreceptors in NRL-deficient mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 534–542. doi:10.1167/iovs.06-0652

- Westerterp-Plantenga, M.S., Saris, W.H., Hukshorn, C.J., Campfield, L.A., 2001. Effects of weekly administration of pegylated recombinant human OB protein on appetite profile and energy metabolism in obese men. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 426–434.
- Wetzel, M.G., Li, J., Alvarez, R.A., Anderson, R.E., O'Brien, P.J., 1991. Metabolism of linolenic acid and docosahexaenoic acid in rat retinas and rod outer segments. *Exp. Eye Res.* 53, 437–446.
- Woods, S.C., Chavez, M., Park, C.R., Riedy, C., Kaiyala, K., Richardson, R.D., Figlewicz, D.P., Schwartz, M.W., Porte, D., Jr, Seeley, R.J., 1996. The evaluation of insulin as a metabolic signal influencing behavior via the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20, 139–144.
- Wu, J.H.Y., Cahill, L.E., Mozaffarian, D., 2013. Effect of fish oil on circulating adiponectin: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 2451–2459. doi:10.1210/jc.2012-3899
- Xu, H., Chen, M., Manivannan, A., Lois, N., Forrester, J.V., 2008. Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice. *Aging Cell* 7, 58–68. doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00351.x
- Xu, H., Chen, M., Mayer, E.J., Forrester, J.V., Dick, A.D., 2007. Turnover of resident retinal microglia in the normal adult mouse. *Glia* 55, 1189–1198. doi:10.1002/glia.20535
- Yamamoto, S., Kamiyama, M., Nitta, K., Yamada, T., Hayasaka, S., 1996. Selective reduction of the S cone electroretinogram in diabetes. *Br. J. Ophthalmol.* 80, 973–975.
- Yang, S.P., Morita, I., Murota, S.I., 1998. Eicosapentaenoic acid attenuates vascular endothelial growth factor-induced proliferation via inhibiting Flk-1 receptor expression in bovine carotid artery endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 176, 342–349. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199808)176:2<342::AID-JCP12>3.0.CO;2-5
- Yan, L.-J., 2014. Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress. *J. Diabetes Res.* 2014, e137919. doi:10.1155/2014/137919
- Yao, J., Jia, L., Shelby, S.J., Ganios, A.M., Feathers, K., Thompson, D.A., Zacks, D.N., 2014. Circadian and noncircadian modulation of autophagy in photoreceptors and retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 3237–3246. doi:10.1167/iovs.13-13336
- Yau, J.W., Rogers, S.L., Kawasaki, R., Lamoureux, E.L., Kowalski, J.W., Bek, T., Chen, S.J., Dekker, J.M., Fletcher, A., Grauslund, J., Haffner, S., Hamman, R.F., Ikram, M.K., Kayama, T., Klein, B.E., Klein, R., Krishnaiah, S., Mayurasakorn, K., O'Hare, J.P., Orchard, T.J., Porta, M., Rema, M., Roy, M.S., Sharma, T., Shaw, J., Taylor, H., Tielsch, J.M., Varma, R., Wang, J.J., Wang, N., West, S., Xu, L., Yasuda, M., Zhang, X., Mitchell, P., Wong, T.Y.; Meta-Analysis for Eye Disease (META-EYE) Study Group., 2012. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes care.* 35(3): 556-554. doi:10.2337/dc.11-1909
- Yi, X., Ogata, N., Komada, M., Yamamoto, C., Takahashi, K., Omori, K., Uyama, M., 1997. Vascular endothelial growth factor expression in choroidal neovascularization in rats. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol.* 235, 313–319.
- Youssef, P.N., Sheibani, N., Albert, D.M., 2011. Retinal light toxicity. *Eye Lond. Engl.* 25, 1–14. doi:10.1038/eye.2010.149

- Yu, D.Y., Cringle, S.J., 2001. Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularised and avascular retinas and in animal models of retinal disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 20, 175–208.
- Zavaroni, I., Sander, S., Scott, S., Reaven, G.M., 1980. Effect of fructose feeding on insulin secretion and insulin action in the rat. *Metabolism.* 29, 970–973.
- Zeng, H., Green, W.R., Tso, M.O.M., 2008. Microglial activation in human diabetic retinopathy. *Arch. Ophthalmol.* 126, 227–232. doi:10.1001/archophthalmol.2007.65
- Zeng, X.X., Ng, Y.K., Ling, E.A., 2000. Neuronal and microglial response in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Vis. Neurosci.* 17, 463–471.
- Zhang, C., Gehlbach, P., Gongora, C., Cano, M., Fariss, R., Hose, S., Nath, A., Green, W.R., Goldberg, M.F., Zigler, J.S., Sinha, D., 2005. A potential role for beta- and gamma-crystallins in the vascular remodeling of the eye. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 234, 36–47. doi:10.1002/dvdy.20494
- Zhang, X., Wen, L., Chen, Y., Zhu, Y., 2009. Vascular endothelial growth factor up-regulates the expression of intracellular adhesion molecule-1 in retinal endothelial cells via reactive oxygen species, but not nitric oxide. *Chin. Med. J. (Engl.)* 122, 338–343.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432. doi:10.1038/372425a0
- Zhao, L., Wang, Z., Liu, Y., Song, Y., Li, Y., Laties, A.M., Wen, R., 2007. Translocation of the retinal pigment epithelium and formation of sub-retinal pigment epithelium deposit induced by subretinal deposit. *Mol. Vis.* 13, 873–880.